

Unterschiedliche Autoregulation am PU.1 Lokus in B-Zellen und myeloischen Zellen

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie
eingereicht an der

Mathematisch Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt Universität zu Berlin
von

Diplom-Biologe Mathias Leddin

Präsident der Humboldt Universität zu Berlin:

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I:

Prof. Dr. Andreas Herrmann

Gutachter: 1. Prof. Dr. Achim Leutz
 2. Prof. Dr. Thomas Sommer
 3. Prof. Dr. Claus Scheidereit

eingereicht: 31.03.2011

Datum der Promotion: 27.10.2011

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	5
1 Material und Methoden	6
1.1 Material.....	6
1.1.1 Generelle Ausrüstung	6
1.1.2 Chemikalien	7
1.1.3 Kits	9
1.1.4 Enzyme.....	9
1.1.5 Puffer	10
1.1.6 Zellkultur-Ausrüstung	11
1.1.7 Zellkultur-Medien und Reagenzien	12
1.1.8 Zelllinien	12
1.1.9 Maus-Präparier-Ausrüstung.....	13
1.1.10 Mausstämme	13
1.1.11 Antikörper.....	13
1.1.12 Software	14
1.1.13 Oligonukleotide	14
1.2 Methoden	17
1.2.1 Molekularbiologie	17
1.2.2 Allgemeine Klonierungstechniken	23
1.2.3 Allgemeine Proteintechniken	25
1.2.4 Zellkulturtechniken.....	27
1.2.5 Mäuse	30
2 Einleitung.....	32
2.1 Genregulation.....	33
2.1.1 <i>cis</i> -regulatorische Elemente.....	34
2.1.2 Transkriptionsfaktoren.....	40
2.2 Hämatopoiese	41

2.2.1	Aufbau des hämatopoietischen Systems	41
2.2.2	Transkriptionsfaktoren in der Hämatopoiese	43
2.3	Ets-Transkriptionsfaktoren	44
2.3.1	Ets-Faktoren und Krebs	45
2.4	PU.1	46
2.4.1	PU.1 und Pathologie	47
2.4.2	Expression von PU.1	49
2.4.3	Regulation	50
2.5	Ziele der Arbeit	52
3	Ergebnisse	53
3.1	Studien mit transgenem humanem PU.1 BAC Maus Model	53
3.1.1	Generierung des transgenen Mausmodels	53
3.1.2	Gewebe- und zelltypische Spezifität der Expression des humanen PU.1 BAC	56
3.1.3	Das humane PU.1 BAC führt zur Wiederherstellung der Hämatopoiese in PU.1 ^{-/-} Mäusen	58
3.1.4	Funktionale Analysen in transgenen humanen PU.1 BAC-Mäusen	60
3.2	Genomweite Analysen der Chromatinstruktur identifizieren neue aktive <i>cis</i> -regulatorische Elemente des PU.1 Lokus	63
3.2.1	Identifizierung eines neuen potentiellen <i>cis</i> -regulatorischen Elementes mittels genomweiter Analysen.	63
3.2.2	Funktionale Synergie zwischen distalen regulatorischen Elementen von PU.1 im Chromatin Kontext.	67
3.3	Myeloisch-spezifische PU.1 Selbstaktivierung ist notwendig - für -12kb DHS Funktion	69
3.3.1	PU.1 Bindung an die -12kb DHS	69
3.3.2	Autoregulation der PU.1-Expression durch die -- 12kb DHS	71
3.4	PU.1 Bindung an die -12kb DHS erfordert die Bindung von - C/EBPα an die URE	72

4 Diskussion.....	78
4.1 Definition der <i>cis</i> -regulatorischen Einheit von PU.1.....	78
4.2 Hierarchie und Synergie <i>cis</i> -regulatorischer Elemente	79
4.3 Spezifische Interaktion der URE mit -12kb DHS in myeloischen Zellen 81	
4.4 PU.1 Regulation in B-lymphoiden Zellen	83
Literaturverzeichnis.....	85
Abkürzungen	100
Selbstständigkeitserklärung.....	106
Danksagung	107
Publikationsliste	108

Zusammenfassung

Als Schlüsselfaktor des hämatopoietischen Systems spielt PU.1 eine entscheidende Rolle in der Entwicklung der meisten hämatopoietischen Linien. Das PU.1 Expressionslevel bestimmt das Differenzierungspotential hämatopoietischer Stammzellen und Vorläufer. In den unterschiedlichen Zelltypen werden verschiedene Expressionsstärken etabliert. Wie diese zelltypischen Expressionslevel von PU.1 generiert werden, ist bisher weitgehend unbekannt.

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde mit Hilfe eines transgenen Mausmodells die *cis*-regulatorische Einheit von PU.1 definiert, um mit nachfolgenden molekularbiologischen und genomweiten Ansätzen Mechanismen der zellspezifischen Regulation von PU.1 zu aufzuzeigen.

Die Definition der *cis*-regulatorischen Einheit von PU.1 erfolgte mit Hilfe eines transgenen Mausmodells, welches ein humanes PU.1 BAC Konstrukt trägt. Es konnte gezeigt werden, dass humanes und murines PU.1 substituierbar sind und den gleichen Regulationsmechanismen unterliegen. Mit Hilfe genomweite DNaseI hypersensitivity Analysen, Methylierungs- und Bindungsstudien konnte ein neuer Regulationsmechanismus beschrieben werden, der eine spezifische kombinatorische Interaktion verschiedener *cis*-regulatorischer Elemente erfordert. Durch Reportergenassays in verschiedenen Zelltypen war es möglich, einen myeloischen Enhancer zu identifizieren. Es konnte gezeigt werden, dass PU.1 mit zelltypspezifischen Transkriptionsfaktoren interagiert, um unterschiedliche Bindungsmuster an seinen regulatorischen Elementen zu etablieren. Dadurch kommt es zu den spezifischen Expressionstärken von PU.1

Schlagworte: PU.1; Genregulation; hämatopoietisches System; BAC

1 Material und Methoden

1.1 Material

1.1.1 Generelle Ausrüstung

7300 Real Time PCR-System (Applied Biosystems)

Agarose-Gel-Kammern (Biosteps)

Bioruptor (Diagenode)

CHEF Mapper XA System (Biorad)

DW2 Wasserbad (Julabo)

FACS LSRII (BD-Biosciences)

FACS Aria (BD-Biosciences)

Geldoc 2000 (Biorad)

GenePulser (Biorad)

Hybridisierungsofen (Techne)

Immersionsöl (Merck)

Inkubator (Binder)

Luminometer Centro 960 (Berthold Technologies)

Mastercycler Gradient (Eppendorf)

Mikroskop DMIL (Leica)

Multizentrifuge 3 S-R (Hereaus)

Nanodrop Spektrophotometer (Nanodrop)

Nylon Membran (Pall Corporation)

Netzgerät EV 231 (Consort)

Polyacrylamid-Gel-Kammern (Biorad)

PVDF Membran (Pall Corporation)

Stratalinker 2400 (Stratagene)

Thermomixer kompakt (Eppendorf)

Tischzentrifuge Pico 17 (Hereaus)

Vortex Genie 2 (Scientific Industries)

XAR Film (Kodak)

XAR-Filmentwicklung (Fuji)

Zellkultur-Werkbank (BDK)

1.1.2 Chemikalien

100 bp DNA-Ladder (Fermentas)

1kb DNA-Ladder (Fermentas)

[α 32-P]dCTP (Roth)

[γ 32-P]dATP (Roth)

β -Mercaptoethanol (Sigma)

Agarose (Roth)

Bis-Acrylamid (Roth)

Borsäure (Roth)

Bromphenolblau (Roth)

Bovine Serum Albumin (Roth)

Chloroform (Roth)

Isoamylalkohol (Roth)

Desoxycholsäure (Roth)

dNTPs (Fermentas)

DTT (Fermentas)

Ethanol (MDC-Lager)

Ethidium Bromid (Roth)

Ethylenediamintetraacetat (EDTA) (Roth)

Eisessig (Roth)

Formaldehyd (Roth)

Giemsa Färbelösung (Fluka)

Glycerol (Roth)

Glycine (Roth)

HCl (Roth)

1. Material und Methoden

Hepes (PAA)
Histofix (Roth)
Hybri-Quick (Roth)
Isopropanol (Roth)
KCL (Roth)
KH₂PO₄ (Roth)
LB Medium (Roth)
LB-Agar (Roth)
LiCl (Roth)
May/Grünwald Färbelösung (Fluka)
Methanol (Roth)
MgCl₂ (Roth)
Na₂HPO₄ (Roth)
NaCl (Roth)
NaHCO₃ (Roth)
NP40 (Roth)
Phenol (Roth)
Poly(I:C) (Invivogen)
Propidium Iodid (PI) (Sigma Aldrich)
Protein Marker (Fermentas)
Puromycin (Roth)
RNase freies Wasser (Quiagen)
Sodium Citrat (Roth)
Sodium Dodecyl Sulfat (SDS) (Roth)
Tri-Chlor-Essigsäure (TCA) (Roth)
Tris, basisch (Roth)
Tris-CL (Roth)
Triton X-100 (Roth)
Trizol (PeqLab)
Trypan-Blau-Lösung (Sigma)

Xylen-Cyanol (Roth)

1.1.3 Kits

Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega)

Genomic DNA Invisorb Kit III (Invitex)

Invisorb Spin DNA Extraction-Kit (Invitex)

Invisorb Spin Plasmid Mini-II-Kit (Invitex)

Nucleobond 100 Kit (Macherey Nagel)

Purelink Plasmid Midi Kit (Invitrogen)

Purelink Plasmid Maxi Kit (Invitrogen)

Rapace Kit (Invitex)

Rediprime II DNA Labeling System (Amersham)

Revert™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas)

RNeasy Mini oder Micro-Elute Kit (Qiagen)

Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)

1.1.4 Enzyme

DNAseI (Fermentas)

Klenow Fragment (New England Biolabs)

Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)

Protease Inhibitoren (Sigma)

Proteinase K (Roth)

Restriktionsenzyme (Fermentas)

Ribo Lock RNase Inhibitor (Fermentas)

Superscript II (Fermentas)

T4-DNA-Ligase (New England Biolabs)

T4 DNA Polymerase (Fermentas)

T4 Polynucleotid Kinase (Fermentas)

Taq-Polymerase (Fermentas, Roboklon)

TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)

1.1.5 Puffer

4x Tris/SDS pH 6,8 (18,6 g Tris basisch; 6ml 20% SDS, pH 6,8 mit HCl in 300 ml Wasser)

4x Tris/SDS pH 8,8 (91g Tris basisch; 10 ml 20% SDS, pH 8,8 mit HCl in 500 ml Wasser)

6x Ladepuffer für Gelelektrophorese (0,25 % Bromophenolblau; 0,26 % Xylene Cyanol; 30 % Glycerol)

20x SSC (3 M NaCl; 0,3 M Sodium Citrate; 1 mM EDTA)

ChIP Elutionspuffer (100 mM NaHCO₃; 1%SDS)

ChIP IP Verdünnungspuffer (20 mM Tris, pH 8,1; 2 mM EDTA; 150 mM NaCl; 1% Triton X-100; 0.01 % SDS; Protease Inhibitoren)

ChIP IP Waschpuffer I (20 mM Tris, pH 8,1; 2 mM EDTA; 50 mM NaCl; 1% Triton X-100; 0,1% SDS; Protease Inhibitoren)

ChIP IP Waschpuffer II (20 mM Tris, pH 8,1; 1 mM EDTA; 0,25 M LiCl; 1% NP40; 1% Desoxycholsäure; Protease Inhibitoren)

ChIP Kern-Lysis Puffer (50 mM Tris, pH 8,1; 10 mM EDTA, 1 % SDS; Protease Inhibitoren)

ChIP Zell-Lysis Puffer (10 mM Tris, pH 8,0; 10 mM NaCl; 0.2 % NP40; Protease Inhibitoren)

Einfriermedium für Zellen (10 % DMSO in FCS)

EMSA Bindepuffer (20 mM Hepes pH 7,6; 10% Glycerol; 2 mM EDTA; 2mM DTT, 10 mM CaCl₂; 100 mM KCl in Wasser)

Erythrozytenlyse-Puffer (0,15 M NH₄Cl; 10 mM KHCO₃; 0,1 mM EDTA, pH 7,3)

FACS-Puffer (2 % FCS; 2 mM EDTA in PBS)

Gewebe-Verdauungspuffer (10 mM Tris-Cl, pH 8.0; 10 mM EDTA, pH 8.0; 50 mM NaCl; 0.5 % SDS)

Laufpuffer für Western (3,4 g Tris basisch; 14,4 g Glycine; 5 ml 20 % SDS in 1 l Wasser)

1. Material und Methoden

Phosphat-gepufferte Saline (137 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄)

SDS-Proben Puffer (0,5 M Tris-Cl pH 6,8; 5% Glycerol; 2% SDS; 100 mM DTT)

Southernblot Waschlösung I (100 ml 20 x SSC; 10 ml 20 % SDS, 890 ml Wasser)

Southernblot Waschlösung II (10 ml 20 x SSC; 10 ml 20 % SDS; 980 ml Wasser)

TE-Puffer (10 mM Tris; 1 mM EDTA, pH 7.5)

Transferpuffer für Western (3,4 g Tris basisch; 14,4 g Glycine; 200 ml Methanol in 1 l Wasser)

Tris-Acetate-EDTA Puffer (TAE) (242 g Tris basisch; 57,1 ml Eisessig; 100 ml 0,5 M EDTA; pH 8,0 in 20 l Wasser)

Tris-Bor-EDTA Puffer (TBE) (10,8 g Tris basisch; 5,5 g Borsäure; 0,93 g EDTA in 1 l Wasser)

1.1.6 Zellkultur-Ausrüstung

Filter, steril, 0,22 µm und 0,45 µm PVDF (Roth)

Kulturschalen, steril, verschiedenen Größen (TPP oder Falcon)

Kryoröhrchen, steril (Nunc)

MACS® Cell Separation LS Säulen (Milteny)

MACS® MultiStand (Milteny)

Nadeln, verschiedene Größen (Neoject)

Neubauer-Zählkammer (Superior Marienfeld)

Polystyrene-Röhrchen, 5ml (BD-Biosciences)

Serologische Pipetten, verschiedene Größen (Falcon)

Skalpelle, steril (Braun)

Spritzen, verschiedene Größen (Braun, Omifix, BS Plastic)

Zellsiebe, steril, verschiedenen Größen (BD-Biosciences)

Zentrifugenröhrchen, verschiedenen Größen (TPP oder Falcon)

1.1.7 Zellkultur-Medien und Reagenzien

Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium (DMEM), Glukose (4.5 g/l) (PAA)

Dulbecco's Phosphat-gepufferte Saline 1 x, ohne Ca & Mg (PAA)

Fötales Kälberserum (FCS) (Biochrom)

Fungizone, antimykotisches Reagenz (Invitrogen)

G-CSF (Pepro Tech Inc.)

GM-CSF (Pepro Tech Inc.)

Gentamicin (PAA)

Glutamin, 200 mM (PAA)

Iscove's modifiziertes DMEM (IMDM) (PAA)

M-CSF (Pepro Tech Inc.)

MethoCult® M3234 (Stem Cell Technologies)

N,N-dimethylsulfoxide (DMSO)

Penicillin/Streptomycin (PAA)

Trypsin EDTA (PAA)

1.1.8 Zelllinien

416B (Dexter, et al., 1979)

BW 5147 (Leddin, et al., 2011)

C10 (Bussmann, et al., 2009)

HL60 (Leddin, et al., 2011)

HM1 (Smith, et al., 2008)

HPC-7 (Leddin, et al., 2011)

Namalwa (ATCC CRL-1432)

Plat-E (Morita, et al., 2000)

RAW 264.7 (Leddin, et al., 2011)

URE^{+/+}: Diese Zelllinie wurde generiert aus einer myeloisch-leukämischen Maus, der zuvor myc-transformierte Zellen transplantiert wurden.

URE^{-/-}: Diese Zelllinie wurde generiert aus einer URE^{-/-} Maus mit myeloischer Leukämie.

Beide URE-Zelllinien wachsen in DMEM mit 20% FCS und 10ng/ml Interleukin 3. (Leddin, et al., 2011)

1.1.9 Maus-Präparier-Ausrüstung

Präparierbrett und Nadeln, sterilisiert

Scheren und Pinzette, sterilisiert

Skalpelle, sterilisiert (Cutfix)

EDTA-behandelte Kanülen (Brand)

1.1.10 Mausstämme

PU.1^{-/-} (Iwasaki, et al., 2005)

URE^{-/-} (Rosenbauer, et al., 2004)

BAC#55; BAC#1 (Leddin, et al., 2011)

1.1.11 Antikörper

β-Tubulin (Sigma)

Acetyl Histone H3 (Millipore)

B220 (RA3-6B2) (Biolegend)

Cd3ε (145-2C11) (BD-Bioscience)

CD4 (GK1.5) (BD-Bioscience)

CD8α (53-6.7) (Biolegend)

CD11b/Mac1 (M1/70) (Biolegend)

CD19 (1D3) (eBioscience)

CD19 Beads (Milteny)

CD34 (RAM34) (BD-Bioscience)

CD117/c-kit (2B8) (eBioscience)

Fcγ RII/III (2.4G2) (BD-Bioscience)

Flt3 (A2F10.1) (Biolegend)
Gr1 (RB6-8C5) (eBioscience)
IgM (R6-60.2) (BD-Bioscience)
Kompensationsbeads Ratte IgG (BD-Bioscience)
Mouse IgG-HRP (Santa Cruz Biotech)
Pol. II (N20) (Santa Cruz Biotech)
PU.1 (T-21X) (Santa Cruz Biotech)
Rabbit IgG (Millipore)
Rabbit-IgG-HRP (Santa Cruz Biotech)
Sca1 (E13-161-7) (Biolegend)

1.1.12 Software

AxioVison (Carl Zeiss)
Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; Stand Dez. 2010)
Ensembl (<http://ensembl.org/index.html>; Stand Dez 2010)
FACSDiva (BD-Bioscience)
FlowJo (Treestar)
GIMP (<http://www.gimp.org/>, Stand Dez. 2010)
ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/disclaimer.html>, Stand Dez. 2010)
Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>; Stand Dez. 2010)
UCSB Browser (<http://genome.ucsc.edu>; Stand Dez. 2010)
Vector NTI (Invitrogen)
VISTA (<http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml>; Stand Dez.2010)

1.1.13 Oligonukleotide

Primer	Sequenz
Bac-Integrität	
Integrität Bac 1 ff	att ccg cat aag cca ctg ag
Integrität Bac 1 rev	gcc ggg aca aac aga gtc ta

1. Material und Methoden

Integrität Bac 2 ff	ggc aat atg tca ggg agg tg
Integrität Bac 2 rev	atg act gga tgg gac tgg ag
Integrität Bac 3 ff	att ggg cct tct gaa acc tt
Integrität Bac 3 rev	tct cag tcc acc atc atc ca
Integrität Bac 4 ff	cat ctg atc ccc tcc aga ga
Integrität Bac 4 rev	cag caa agg ctt ttg aga cc
Integrität Bac 5 ff	ggg gtc ctc atg ata gct ca
Integrität Bac 5 rev	gat cca agt cag acc cca ga
PU1 after rigth ff	cag caa agg ctt ttg aga cc
PU1 after rigth rev	tca cct tca cct cca tcc tc
hPU.1 bac5'ff	gca gcg aca gca cag ttt ag
hPU.1 bac5'rev	ggc ccc tca ctc aca ctt ta
hPU.1Bac145kb ff	tgg cta cta ctt ccg cgt ct
hPU.1Bac145kb re	agt tcc cta cct tgg ggc ta
hPU.1Bac 36kb ff	ctc cct cgc agg agt cta tg
hPU.1Bac 36kb re	taa cct act ggc ccc aag tg
hPU.1Bac 28kb ff	ggg gtc ttg atg ggg aag aa
hPU.1Bac 28kb re	gaa tgt cag cag caa ggt ca
Genotypisierung	
PU.1 KO/FI I	ctt cac tgc cca ttc att ggc tca tca
PU.1 KO/FI II	gct ggg gac aag gtt tga taa ggg aa
PU.1 KO/FI III	caa ccg gat cta gac tcg agg a
Bac I ff	ggc aat atg tca ggg agg tg
Bac I rev	atg act gga tgg gac tgg ag
Bac II ff	ctg gag gac act gtg aag ca
Bac II rev	ttg gag cag cca ctt aac ct
URE I	cgg gat ccc tgg tca gtt ttc tca c
URE II	att tgc ggc cgc ttg caa tga ggg aca aac aa
URE NEO-	gcc aac tca gca ctc agg ca
URE NEO+	ata gat ctc tcg tgg ggt cat tgt

Genexpression

Luc RT ff	cac aga atc gtc gta tgc agt ga
Luc RT rev	gca acc cct ttt tgg aaa ca
β -Actin RT ff	tga cat c cg taa aga cct cta
β -Actin RT rev	cag gag gag caa tga tct tga
hPU.1 Taq ff	gga gag cca tag cga cca tta c
hPU.1 Taq rev	cgg cga agc tct cga act c
hPU.1 MGB Probe	ctt cca ccc cca cca cgt gca
mPU.1 Taq ff	aga agc tga tgg ctt gga gc
mPU.1 Taq rev	gcg aat ctt ttt ctt gct gcc
mPU.1 FAM Probe	tgg gcc agg tct tct gca cgg
<i>β-actin</i> endogenous control	4352341E (ABI)
EBF ff	Caa gac aag aac cct gaa atg
EBF rev	Gta acc tct gga agc cgt agt
IL7R ff	Tta ctt caa agg ctt ctg gag
IL7R rev	Ctg gct tca acg cct ttc acc tca
M-CSFR ff	aat ggc agt gtg gaa tgg gat gg
M-CSFR rev	gtg ggg gct ctg ggt gga ctc
GM-CSFR ff	gtg cgg ggc cag tgc ggt tcc t
GM-CSFR rev	cgc ccc agt gct tca tcc tcg tgt
gen.mPu.1 ff	cga ggc aaa aat gag aag ata aat
gen.mPu.1 rev	taa ctg gat tat agg ggg aga atg

Klonierung/EMSA

-15kb ff	ttt ctc ctg ctt cga ctt cc
-15kb rev	gag gcc tgt gtt cct tca ac
-14kb ff	gtg tgg tgc ctg tgg taa ta
-14kb rev	tgc ctg aga aaa cag gaa gc
-12kb ff	cag agc ggg cag cta ttt ac
-12kb rev	ggg gaa gga aag agg aag c
-10kb ff	ctc tga aaa gca ccg ttt cc

1. Material und Methoden

-10kb rev	act ttg tga ggg gcc tga g
NdeI-KpnI-NdeI	tat ggg tac cca
NdeI-XhoI-NdeI	tat gct cga gca
HindIII-NheI-HindIII	agc ttg cta gca
CEBPa C1-2 mut R URE	agtc aacgcgtaacgccaacagccccggaaccaca
CEBPa C1-2 mut F URE	agtc tgtggttcggggctgttggttacgcgtt
CEBPa C5 mut R URE	agtc ggctgcagctgcccctggatccaca
CEBPa C5 mut F URE	agtc tgtggatccaggggcagctgcagcc
PU1 site (sense) -12kb	gatc tcc cca tgg ctt cct ctt tcc ttc c
PU1 site (anti) -12kb	gatc gga agg aaa gag gaa gcc atg ggg a
PU.1 site (mute sense) -12kb	agtc tcc cca tgg cgc gct ctt tcc ttc c
PU.1 site (mute anti) -12kb	agtc gga agg aaa gag cgc gcc atg ggg a
PU.1_Prom_ff	gat cca cgc tct cgc tat tc
PU.1_Prom_rev	gcg cta cag gaa gtc tct gg
shRNA-mPU.1-sense	acc tcg aag ctc acc tac cag ttc tca aga gga act ggt agg tga gct tct t
shRNA-mPU.1-anti	caa aaa gaa gct cac cta cca gtt cct ctt gag aac tgg tag gtg agc ttc g

Alle Oligonucleotide wurden von Biotez oder MWG hergestellt.

1.2 Methoden

1.2.1 Molekularbiologie

1.2.1.1 Präparation genomischer DNA

Die Extraktion genomischer DNA aus Zellen und Gewebe erfolgte nach Standardprotokollen. Zellen oder Gewebe wurden in Gewebe-verdauungspuffer mit Proteinase K (10µg/ml) über Nacht bei 56°C im Wasserbad inkubiert und am nächsten Tag mittels Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Extraktion (siehe 1.2.1.5) aufgereinigt.

1.2.1.2 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte an Hand der mitgelieferten Protokolle des Purelink Midi oder Maxi Kits.

1.2.1.3 Präparation von RNA

RNA wurde aus Geweben und Zellen entweder mittels Trizol oder der RNeasy Kits an Hand der mitgelieferten Firmenprotokolle extrahiert.

1.2.1.4 cDNA Synthese

Die cDNA Synthese der gewonnenen RNA erfolgte mittels des cDNA-RT-Kits nach mitgelieferten Firmenprotokollen.

1.2.1.5 Phenol/Chloroform/Extraktion

Zur Trennung eines Protein-DNA-Gemisches wurde die Phenol-Chloroform-Extraktion angewandt. Die DNA-Lösung wurde mit 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol versetzt, gemischt und dann zentrifugiert (13000rpm/1min./RT). Danach wurde die obere wässrige Phase abgenommen und erneut mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol versetzt. Nach erneutem Mischen wurde wieder zentrifugiert (13000rpm/1min./RT). Die obere Phase enthielt jetzt die DNA. Danach erfolgte eine DNA-Fällung (siehe 2.2.1.6).

1.2.1.6 Nukleinsäurefällung mittels Isopropanol

Die Fällung von Nukleinsäuren erfolgte durch Isopropanol. Die DNA-enhaltene Lösung wurde mit 0.7 Vol. Isopropanol versetzt, gemischt und zentrifugiert (13000rpm/20min./RT). Danach erfolgte ein Waschschriff mit 100% Ethanol und ein weiterer mit 70% Ethanol. Beide Waschschriffe wurden bei 13000rpm für 5min. zentrifugiert. Anschließend wurde das Pel-

let luftgetrocknet und in einem geeigneten Volumen Wasser oder TE-Puffer aufgenommen.

1.2.1.7 Gelelektrophorese

DNA-Agarosegele

Agarosegele wurden in unterschiedlichen Konzentrationen (0,7%-2%) benutzt. Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht und anschließend auf ca. 60°C abgekühlt. Ethidiumbromid (0,5µg/ml) wurde dazugegeben. Die Lösung wurde in eine Gelkammer gegossen und mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Die aufzutrennenden Proben wurden mit 0.1 Volumen 10x Gel-Lade-Puffer vermischt und anschließend in die Gel-taschen pipettiert. Je nach Größe des Gels betrug die angelegte Spannung 50 – 120V. Die Dokumentation erfolgte unter UV-Licht.

Polyacrylamidgele für EMSA

Zur Auftrennung der radioaktiv markierten Proben des EMSA wurden 7 %-ige Polyacrylamidgele verwendet. 2 Glasplatten wurden vorher dazu mit 70% Ethanol gewaschen und in die Gelapparatur eingespannt. Nach dem Verfestigen des Gels, bestehend aus folgenden Reagenzien: 17,5ml Acr-lamid; 5ml 10xTBE-Puffer; 77,5ml Wasser; 1ml Ammoniumpersulfat; 50µl Temed erfolgte der Gellauf bei einer Spannung von 150V im Kühlraum.

1.2.1.8 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und quantitative Echt-Zeit-PCR (qPCR)

Die PCR-Reaktion erfolgte nach Standardprotokollen unter Zugabe folgender Reagenzien in der angegebenen Endkonzentration: 0,25 µM ff-Primer; 0,25µM rev-Primer; 0,5mM dNTPs; 2mM MgCl₂; 1x (NH₄)₂SO₄ - oder KCl-Puffer und 5U/µl Taq-Polymerase. Die amplifizierten PCR-

Produkte wurden auf der Größe entsprechenden Agarosegelen analysiert. Primer für PCR und qPCR wurden mit Primer3 identifiziert. Für die quantitative Analyse der Genexpression wurden Exon/Exon spannende Primer hergestellt, um Signale durch verbleibende genomische DNA-Kontaminationen auszuschließen. Die Reaktion erfolgte mit SYBR green oder TaqMan Mastermix der Firma ABI nach mitgelieferten Firmenprotokollen des 7300 Real Time Systems. Die Analyse der generierten Daten erfolgte durch die mitgelieferte Software des Systems.

1.2.1.9 Integrationsanalyse durch Southern Blot

Die Analyse der Integration der BAC- und Luciferasekonstrukte erfolgte mit einem Southern Blot. Mind. 10µg genomische DNA wurden mit EcoRI verdaut, auf einem 0,7% Agarosegel aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran transferiert. Die DNA wurde durch UV-Licht auf der Membran fixiert und für mind. 4h in Roti-Hybri-Quick bei 60°C prähybridisiert. Die Hybridisierung bei 60°C über Nacht erfolgte mit Sonden, die für die BAC-Integration 8kb am 5'-Ende von PU.1 als PCR-Produkt amplifiziert oder für die Luciferase mittels EcoRI-EcoRV Restriktionsverdau aus dem pxp2-Vektor ausgeschnitten wurde. Die Membranen wurden danach je 2x mit Southern Blot-Waschlösung I und II gewaschen. Die Entwicklung der Filter erfolgte durch XAR-Filme von Kodak.

1.2.1.10 Restriktionsverdau

Analytischer Restriktionsverdau

Zum Nachweis eines Inserts in einem Vektor wurden nach einer Klonierung oder Plasmidpräparation 0.5µg-2µg DNA für einen Restriktionsverdau eingesetzt. Es wurden zwischen 5 und 10U Restriktionsenzym mit dem zugehörigen Enzym-Reaktionspuffer verwendet. Das Endvolumen betrug

in der Regel 10µl. Die Reaktion wurde für mindestens 1h bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend auf Agarosegelen analysiert.

Präparativer Restriktionsverdau

Zur Linearisierung eines Vektors oder zur quantitativen Isolierung eines Inserts wurden 5µg-10µg DNA eingesetzt. Diese wurden mit 10 bis 20U Restriktionsenzym und zugehörigem Restriktions-Enzympuffer über Nacht bei 37°C in einem Endvolumen von mind. 20µl inkubiert. Am nächsten Tag wurde die DNA elektrophoretisch aufgetrennt und aus dem Gel mittels des Invitek-Kits eluiert.

1.2.1.11 Ligation

Bei den hier durchgeführten Ligationen wurden molare Vektor/Insert - Verhältnisse von 1:10 nach folgendem Ansatz eingesetzt: 50ng Vektor; 10x molarer Überschuss an Insert- DNA; 1x Ligationspuffer; 2000U T4 DNA-Ligase; Auffüllen auf 10µl H₂O Der Ansatz wurde für entweder eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16°C inkubiert.

1.2.1.12 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

1.Tag

2x10⁷ Zellen wurden mit 1% Formaldehyd für 10min. bei Raumtemperatur (RT) vernetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Glycin (0,125M) abgestoppt und 5 min. bei RT geschüttelt. Die Zellen wurden in ein 15ml Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (260g/8min./4°C). Das Zellpellet wurde mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (260g/5min./4°C). Die Zellen wurden in 400µl Zell-Lyse-Puffer auf Eis für 10min. lysiert. Nach Zentrifugation (600g/5min./4°C) erfolgte die Kernlyse in 400µl Kern-Lysis-Puffer und Proteaseinhibitoren bei 4°C für 10min. Nach Auffüllen des Vo-

1. Material und Methoden

lumens auf 1 ml erfolgte die Sonifizierung. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (13000rpm/10min./4°C), der Überstand in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und dann für eine Stunde in einem Rotator bei 4°C mit 50µL Hasenserum vorgeklärt. Über Nacht wurden 100µl Protein A Sepharose dazugegeben und bei 4°C rotiert.

2.Tag

Proben wurden zentrifugiert (750g/2min./4°C) und der Überstand in 200 µl Aliquots aufgeteilt. Diese wurden mit 400 µl IP-Verdünnungspuffer und Proteaseinhibitoren verdünnt. 1-5 µg des jeweiligen Antikörpers wurden zugegeben und die Proben bei 4°C 3 Stunden in einem Rotator inkubiert. Nach Zentrifugation (13000rpm/5min./RT) wurden zum Überstand 30 µl Protein A Sepharose gegeben und 2 Stunden bei 4°C in einem Rotator inkubiert. Nach Zentrifugation (7500rpm/2min./RT) wurden die Sepharosepellets zweimal mit 500µL Waschpuffer 1 und Proteaseinhibitoren, einmal mit Waschpuffer 2 und Proteaseinhibitoren und zweimal mit TE bei 4°C gewaschen. Die Elution erfolgte durch Zugabe von zweimal 150 µl Elutionspuffer und anschließender Zentrifugation. Durch Inkubation mit 1µl RNaseA (1mg/ml) und 18 µl 5 M NaCl für 4 Stunden bei 67°C wurde die Vernetzung wieder aufgehoben. Anschließend wurden die Proben bei -80°C eingefroren.

3.Tag

Nach dem Auftauen wurde für 2 Stunden mit 6µl Proteinase K (10 mg/ml) bei 45°C inkubiert. Die Proben wurden auf 300µl mit TE aufgefüllt und anschließend mit Phenol/Chloroform/Extraktion aufgereinigt. Die DNA-Fällung wurde mit 30µl 3M NaAc und 5µg Glykogen für 2 Stunden bei -20°C durchgeführt. Nach Zentrifugation (13000rpm/20min./RT) und waschen mit 70%-igem Ethanol wurde das DNA-Pellet luftgetrocknet. Nach

dem die DNA in TE aufgelöst wurde, konnte sie für die anschließende Quantifizierung verwendet werden.

1.2.2 Allgemeine Klonierungstechniken

1.2.2.1 Klonierung und Mutagenese der Luciferasekonstrukte

Die Klonierung der regulatorischen Elemente erfolgte nach Abbildung 1. Alle Restriktionsenzyme und zugehörigen Puffer wurden an Hand der Anweisungen der Firma Fermentas benutzt.

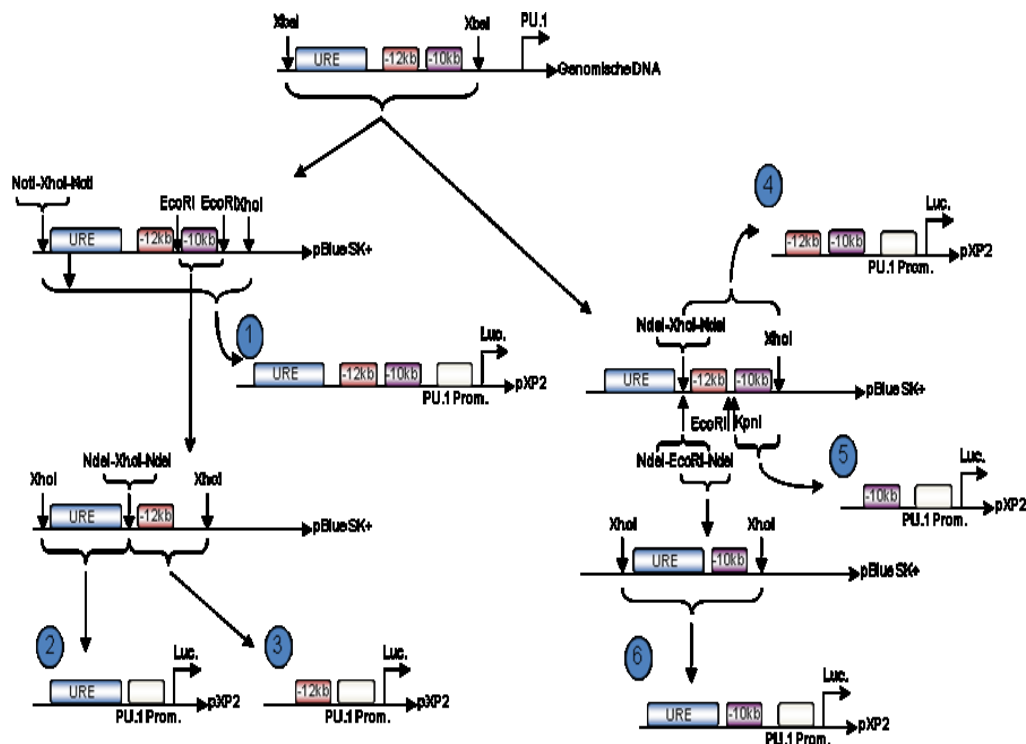


Abbildung 1: Klonierungsstrategie zur Herstellung der Reporter-Genkonstrukte mit verschiedenen Kombinationen *cis*-regulatorischer Elemente des hämatopoietischen Transkriptionsfaktors PU.1.

Nummerierte Konstrukte wurden stabil transfiziert zur Beurteilung der Enhancer-Aktivität.

Die anschließende Mutagenese der verschiedenen Bindestellen in den regulatorischen Elementen wurde mit dem Site Directed Mutagenesis Kit an Hand der mitgelieferten Protokolle mit folgenden Primer durchgeführt: [CEBPa C1-2 mut R URE; CEBPa C1-2 mut F URE]; [CEBPa C5 mut R URE; CEBPa C5 mut F URE]; [PU.1 site (mute sense) -12kb, PU.1 site (mute anti) -12kb]

1.2.2.2 Klonierung der shRNA Konstrukte

Die ShRNA-Sequenzen wurden beschrieben in Lausen et al. (Lausen, et al., 2006) und in den h7SK-GFPzeo vector an Hand der mitgelieferten Protokolle der Firma Invitrogen kloniert. Funktion der shRNA wurde kontrolliert durch qPCR und Western Blot.

1.2.2.3 Herstellung kompetenter Bakterien zur Hitzeschock-Transformation

Von einer Einzelkolonie des betreffenden Bakterienstammes wurden 100 ml einer Übernachtskultur angefertigt. Am nächsten Tag wurden 5 ml davon entnommen, zu 500 ml LB-Medium gegeben und bis zu einer OD₅₉₅ von 0.4 bis 0.6 (ca. 3 – 4 Stunden) bei 37 °C geschüttelt. Die Suspension wurde 3min. auf einem NaCl/Eis-Gemisch abgekühlt (in vorgekühlten Glaswaren) und anschließend pelletiert (4600rpm/20min./4°C). Das Bakterienpellet wurde in 200ml eiskalter 0,1M CaCl₂ -Lösung aufgenommen und 30min. auf einem NaCl/Eis-Gemisch inkubiert. Nach Zentrifugation (4600rpm/10min./4°C) wurde das Pellet in 15ml eiskalter 0,1M CaCl₂ resuspendiert, mit 2.5ml eiskaltem Glycerol gemischt und in Aliquots zu je 200µl in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert. Ein Aliquot wurde auf einer Ampicillinplatte ausgestrichen, um die Existenz von Resistenzen ausschließen zu können. Die Qualität der so generierten kompetenten Bakterien wurde durch eine Testtransformation mit 10 ng Plasmid

DNA überprüft. Die Transformationsrate sollte nicht unter 10^6 Transformanten/ μg DNA liegen.

1.2.2.4 Transformation von Ligationsansätzen und Plasmiden mittels Hitzeschock

Für die Transformation von Ligationsansätzen wurden 200 μl Aliquots kompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut. Dazu wurden 5 μl Ligationsansatz (50 – 100 ng DNA) gegeben und 30min. auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde für 90sek. bei 42°C im Wasserbad inkubiert und weitere 2min. auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 1ml LB-Medium wurde 50min. bei 37°C geschüttelt. Abschließend wurden verschiedene Volumina zwischen 50 – 200 μl auf LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

1.2.2.5 Genomweite Datensets/ DNaseI footprint

Die genomweiten DNaseI hypersensitivity Daten und der DNaseI footprint wurden generiert wie beschrieben (Leddin, et al., 2011). CHIP-Sequenzierungsdaten für PU.1 und C/EBP α wurden beschrieben in (Heinz, et al., 2010). Die P300 Datensets sind von Ghisletti, et al., (2010). Die Analyse der Daten wurde ebenfalls in Leddin, et al., (2011) beschrieben.

1.2.3 Allgemeine Proteintechniken

1.2.3.1 Zellkernextrakte

3×10^7 Zellen wurden in 10ml PBS (PAA) aufgenommen, 2x mit 10ml PBS gewaschen und anschließend in 1 ml PBS aufgenommen. Nach Zentrifugation bei (13000/15sek./4°C) wurde das Pellet in eiskaltem Puffer A resuspendiert. Die Zellen wurden 15min. auf Eis inkubiert, mit 25 μl 10% NP 40 versetzt, 10sek. gemischt und zentrifugiert (13000rpm/30sek./4°C). Das Zellkernpellet wurde in 50 μl eiskaltem Puffer C resuspendiert, bei 4°C

für 15min. kräftig geschüttelt und zentrifugiert (13000rpm/5min./4°C). Der Überstand wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und die Extrakte bei -80 °C gelagert.

1.2.3.2 Gesamtzellextrakte

Zur Extraktion von Protein aus der gesamten Zelle wurden mind. 5×10^5 Zellen in 500µl PBS mit 50µl 100% TCA für mind. 20min. auf 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation (13000rpm/20min./4°C) wurde das Proteinpellet in 100µl 2xProbenpuffer aufgenommen und bis zum erkennbaren Farbumschlag 1M Tris zugegeben. Die Proben wurden 5min. bei 96°C aufgeköcht und konnten bei -20°C gelagert werden.

1.2.3.3 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

In eine Küvette wurde 200µl Bradford-Lösung mit 800µl H₂O gemischt. Dazu wurde 1µl Zellkernextrakt gegeben und nach 5min. die OD₅₉₅ bestimmt. Die Berechnung des Proteingehaltes erfolgte mit Hilfe einer parallel angesetzten Eichgrade mit definierten Mengen an BSA.

1.2.3.4 Western Blot

Der Western Blot wurde wie beschrieben durchgeführt (Rosenbauer, et al., 2008). Es wurden dazu ein polyklonaler Hasen-Antikörper gegen PU.1 und ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen Tubulin benutzt. Die Signale wurden durch HRP-gekoppelte Spezies-spezifischen Sekundärantikörper mittels Chemolumineszenz auf XAR-Film sichtbar gemacht.

1.2.3.5 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Die Signaldetektion erfolgte über eine radioaktive Markierung der DNA-Sonden, die auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht wurde. Die doppelsträngigen Oligonukleotide wurden auf 100 ng/µl eingestellt und folgender An-

1. Material und Methoden

satz hergestellt: 1µl Oligonukleotid; 2µl 10xPuffer; 1µl Polynukleotidkinase; 5µl γ -ATP32; 11µl H₂O. Der Ansatz wurde für 1 Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend auf 100µl aufgefüllt. Die Sonde wurde über eine [G25-Sepharose-Säule] aufgereinigt. Die Herstellung der DNA-Proteinkomplexe wurde wie folgt durchgeführt:

Ansätze	1	2	3	4	5
Protein (5µg)	-	+	+	+	+
10x Binding-Buffer	2µl	2µl	2µl	2µl	2µl
p(I)-p(C) (Sigma)	1µl	1µl	1µl	1µl	1µl
(-12) kb Pu.1 Binding site	-	-	2µl	-	-
(-12) kb Pu.1 Binding site mutant	-	-	-	2µl	-
Pu.1 Antikörper	-	-	-	-	5µl

Die Ansätze wurden auf 20µl mit Wasser aufgefüllt, 15 min. auf Eis inkubiert und mit 5µl radioaktiv markierter DNA versetzt. Nach einer erneuten Inkubation von 15 min. erfolgte der Gellauf in einem 7%-iges Polyacrylamidgel bei ca. 200 V. Das Gel wurde über Nacht bei 80°C getrocknet und am nächsten Tag auf einen XAR-Film gelegt. Der Film wurde nach 1-3 Tagen entwickelt.

1.2.4 Zellkulturtechniken

1.2.4.1 Auftauen, Kultivierung und Einfrieren von Zellen

Zum Auftauen wurden Zellen bei 37°C erwärmt und mit PBS gewaschen, um DMSO zu entfernen. Nach Zentrifugation (1200rpm/5min./RT) wurde das Zellpellet in entsprechendem Medium aufgenommen und ausplattiert. Jede Zelllinie wurde in entsprechendem Medium bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Für das Passagieren adhärenter Zelllinien wurden die Zellen 1x

mit PBS gewaschen und anschließend ca. 5min. mit 0,05% Trypsin-EDTA bei 37°C inkubiert, um sie von der Oberfläche zu lösen. Abgelöste Zellen wurden in Medium aufgenommen und nach Zentrifugation (1200rpm/5min./RT) in von der Zelldichte abhängigem Volumen an Medium wieder ausgesät. Suspensorische Zellen wurden nach Zentrifugation (1200rpm/5min./RT) in geeigneter Dichte in Medium aufgenommen und wieder ausgesät. Zum Einfrieren wurden pelletierte Zellen in 1ml Einfriermedium (FCS with 10 % DMSO) aufgenommen, in Einfrierröhrchen überführt und in Styroporboxen langsam auf -80°C gekühlt. Die Langzeitlagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

1.2.4.2 Messung der Zellzahl und Viabilität

10µl der Zellsuspension wurden mit Trypanblau gemischt und in verschiedenen Verdünnungen von 1:1 bis 1:10 kurz inkubiert. 10µl wurden dann auf die Neubauer-Zählkammer transferiert. Zellen aus mind. einem großen Quadrat wurden gezählt und daraus die Konzentration wie folgt berechnet: Zellen pro ml = Zellen pro Quadrat x 10.000. Zellen, welche Trypanblau aufgenommen haben, wurden als nicht vital definiert und von der Zellzählung ausgeschlossen.

1.2.4.3 Erzeugen stabiler Zelllinien

Für die Reporter-Gen-Assays mit Luciferase wurden stabile Zelllinien generiert. Das Einbringen der DNA in die Zellen erfolgte mittels Elektroporation. Die Plasmid-DNA wurde im Verhältnis 10:1 mit dem Selektionsplasmid gemischt. In diesem Fall wurde auf Puromycinresistenz selektiert. Es wurden 1 µg Resistenzvektor und 10 µg Luciferasevektor eingesetzt. Es wurden 1×10^7 Zellen dreimal mit 10 ml Medium gewaschen und in 1 ml Medium aufgenommen. Das DNA-Gemisch wurde zugegeben und 5 Minuten bei RT inkubiert. Die Elektroporation erfolgte bei 230 V und 960 µF in

4 mm Elektroporationsküvetten Danach wurden je dreimal 1×10^6 ausgesät. 48 h später wurden die Zellen unter Selektionsdruck mit Puromycin (RAW 264.7 mit $3 \mu\text{g/ml}$; Namalwa mit $1,5 \mu\text{g/ml}$) gesetzt. Die Selektion galt als beendet, wenn alle Klone auf der Kontrollplatte ohne DNA-Gemisch gestorben waren. Danach wurden die Einzelklone gepickt und weiterhin unter Puromycin gehalten.

1.2.4.4 Luciferase-Assay

Die selektierten Kulturen bzw. gepickten Einzelklone wurden mit einer Dichte von $5 \times 10^4/\text{well}$ auf 24-well Platten ausgesät. Dabei wurde den Zellen kein Selektionsdruck mehr zugeführt. 24 Stunden später wurden die Zellen an Hand des mitgelieferten Protokolls des DUAL-Luciferase Reporter Assay Systems prozessiert. Die Angaben erfolgen in Relative Light Units (RLU).

1.2.4.5 May-Grünwald/Giemsa-Färbung

1×10^4 Zellen wurden durch Zentrifugation (800rpm/5min./RT) auf Objektträger gebracht und anschließend für 10min. in Methanol fixiert. Danach wurden die Zellen für 5min. in May-Grünwald-Lösung gefärbt, 5min. unter fließendem Leitungswasser gewaschen und 25min. in Giemsa-Lösung gefärbt. Danach wurden sie wieder 5min. in Leitungswasser gewaschen und dann luftgetrocknet. Die Analyse erfolgte mikroskopisch.

1.2.4.6 Methylzellulose-Differenzierungs-Assay

Um das Differenzierungspotential von Stamm- und Vorläuferzellen zu testen, wurden 5×10^4 Knochenmarkszellen in 2,64ml Methylzellulose mit entweder G-CSF, M-CSF oder GM-CSF (jeweils 10 ng/ml) und $600 \mu\text{l}$ Medium aufgenommen und anschließend auf drei 35mm Platten ausplattiert. Nach

7 Tagen wurden die Zellen gezählt sowie morphologisch durch May-Grünwald/Giemsa Färbung als auch mikroskopisch analysiert.

1.2.5 Mäuse

Allgemeine Mausarbeiten wie z.B. die tägliche Tierpflege, Verpaarungen und das Absetzen der Nachkommen wurden in Kooperation mit der Tierzuchtanstalt des Max-Delbrück-Center für Molekulare Medizin (MDC), Berlin durchgeführt. Alle Tiere wurden in speziellen Pathogen-freien Einrichtungen des MDC gehalten. Alle Experimente wurden genehmigt durch lokale Behörden im Rahmen des Tierschutzgesetzes.

1.2.5.1 Mausstämme

Die PU.1^{-/-} und die URE^{-/-} Stämme wurden generiert wie beschrieben (Rosenbauer, et al., 2004; Iwasaki, et al., 2005). Die Verpaarungen erfolgten mit heterozygoten Mäusen, um die Generierung passender Kontrollmäuse zu gewährleisten. Die Generierung der BAC-transgenen Mausstämme erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Leiter des Tierhauses des MDC, Boris Jerichow. Zusammengefasst wurde die DNA des humanen PU.1 BACs (GeneBank AC Nummer: 074195) linearisiert mit NotI und durch Mikroinjektion in fertilisierte Oocyten von FVB/N-Mäusen nach den Protokollen des Tierhauses des MDC eingebracht. Transgene Tiere wurden dann mittels PCR auf den BAC-Lokus identifiziert und weiter mit PU.1 heterozygoten Tieren verpaart, um BAC⁺PU.1^{-/-} und BAC⁺ PU.1^{+/+} zu erhalten.

1.2.5.2 Genotypisierung

Alle Mäuse wurden nach DNA-Extraktion aus dem Schwanz durch PCR typisiert.

1.2.5.3 Präparation von Mausorganen

Mäuse wurden mit CO₂ getötet, mit Alkohol desinfiziert und anschließend auf dem Rücken auf Präparierbrettern fixiert. Die Mäuse wurden mit Scheren und Pinzetten geöffnet und zur Isolierung des Knochenmarks untere und obere Extremitäten entnommen. Andere Organe wie Milz, Thymus, Leber oder Niere wurden bei Bedarf ebenfalls entnommen. Alle Organe wurden in kaltem PBS gelagert. Zur Herstellung von Einzelzellsuspensionen wurden die Organe in kleine Stücke geschnitten und durch ein Mikrosieb gefiltert. Das Knochenmark wurde durch Ausspülen der Knochen mit PBS isoliert. Peripheres Blut lebender Mäuse wurde durch EDTA behandelte Kanülen aus der Schwanzvene entnommen. Erythrozyten wurden durch Inkubation (5min.) in Erythrozyten-Lyse-Puffer lysiert und die verbliebenen Zellen mit PBS gewaschen.

2 Einleitung

Seit der Sequenzierung der Genome verschiedener Spezies und vergleichenden Genomanalysen wird deutlich, dass nicht eine Zunahme der Genanzahl für die immer komplexer werdende Organisation höherer Organismen die Ursache sein kann (Levine, et al., 2003). Vielmehr scheint die Steigerung der Möglichkeiten zur Genregulation eine der entscheidenden Ursachen für die Komplexität höherer Organismen zu sein (Chen, et al., 2007). Es ist daher von enormer Wichtigkeit für das Verständnis der Entwicklung höherer Organismen mit welchen regulatorischen Mechanismen genetische Informationen einer Zelle in verschiedene Zelltypen mit unterschiedlichen Aufgaben umgesetzt werden. Transkriptionsfaktoren kommt durch ihre Fähigkeit Desoxyribonukleinsäure (DNA) zu binden und die Expression anderer Gene zu beeinflussen eine entscheidende Bedeutung als Schlüsselregulatoren zu (Brivanlou, et al., 2002). Sie regulieren in einem genau räumlich und zeitlich festgelegten komplexen Netzwerk, welche Gene exprimiert werden und welche Funktionen eine Zelle übernehmen kann. Bereits die fehlerhafte Expression einzelner Transkriptionsfaktoren kann zu schwerwiegenden Erkrankungen und Entwicklungsstörungen führen (Jimenez-Sanchez, et al., 2001). Obwohl detaillierte Expressionsmuster vieler Transkriptionsfaktoren existieren, sind die Mechanismen, die zu diesen Mustern führen noch nicht ausreichend verstanden. Welche genomischen Sequenzen für die präzise Regulation nötig sind, ist für viele wichtige Transkriptionsfaktoren noch nicht beschrieben und daher von herausragender Bedeutung. In dieser Studie wird die notwendige regulatorische Einheit des hämatopoietischen Transkriptionsfaktors PU.1 beschrieben und ein Mechanismus zur differentiellen Expression von PU.1 in verschiedenen Zelltypen des hämatopoietischen Systems aufgezeigt.

2.1 Genregulation

Um mit der gleichen genetischen Information unterschiedliche Expressionsprogramme zu etablieren, verfügen mehrzellige Organismen auf verschiedenen Ebenen über regulatorische Mechanismen zur Kontrolle der Genexpression. Diese Regulationsmechanismen lassen sich grob in 3 Abschnitte einteilen. (i) Die posttranslationale Kontrolle modifiziert die Funktion und Haltbarkeit von Proteinen durch Prozesse wie z.B. Phosphorylierung (Hunter, et al., 2000) oder Ubiquitinierung (Hershko, et al., 1998). (ii) Posttranskriptionelle Mechanismen prozessieren und regulieren den mRNA Transport und deren Translation. (iii) Als grundlegendster Mechanismus spielt die transkriptionelle Kontrolle der Genexpression die entscheidende Rolle. Neben epigenetischen Mechanismen wird das zeitliche und räumliche Muster der transkriptionellen Initiierung der Genexpression hauptsächlich durch *cis*-regulatorische Sequenzen und Transkriptionsfaktoren bestimmt. Deren Zunahme ist die zentrale Ursache bei der Steigerung der Komplexität höherer Organismen (Vaquerizas, et al., 2009). Während nur 2% des menschlichen Genoms proteinkodierende Sequenzen enthalten, sind geschätzt ca. 33% des menschlichen Genoms regulatorische Elemente (Levine, et al., 2003). Grundlegende Erkenntnisse, dass die Entwicklung komplexer Organismen durch *cis*-regulatorische Elemente gesteuert wird, sind in mehreren Organismen u.a. in *Drosophila* und Seeigel beschrieben worden (Davidson, et al., 2002; Oliveri, et al., 2004). Nicht nur Fehlfunktionen der Gene selber, sondern auch ihrer regulatorischen Elemente können daher schwerwiegende Folgen für den gesamten Organismus haben. Z.B. führen Mutationen in den *cis*-regulatorischen Einheiten von SOX9 zur autosomalen Geschlechtsumkehr (Wagner, et al., 1994). Tabelle 1 gibt einen Überblick über Krankheiten, die durch fehlerhafte regulatorische Sequenzen verursacht werden.

Tabelle 1: Transkriptionelle Elemente, die in humane Krankheiten involviert sind.

Adaptiert von (Maston, et al., 2006)

regulatorisches Element	Krankheit	betroffenes Gen	Referenz
Promotor	β-Thalässemie	β-Globin	Antonarakis, et al., 1984; Kulozik, et al., 1991; Lewis, et al., 2000
	Bernhard-Soulier Syndrom	GpIbβ	Ludlow, et al., 1996
	Hämophilie	Faktor IX	Crossley, et al., 1990
	progressive myoklonische Epilepsie	cystatin B	Lalioti, et al., 1997
	Treacher Collins Syndrom	TCOF1	Masotti, et al., 2005
Enhancer	Präaxiale Polydaktylie	SHH	Lettice, et al., 2003
	Van Buchem Krankheit	Sclerostin	Loots, et al., 2005
	X-chromosomale Taubheit DFN3	POU3F4	De Kok, et al., 1996
Silencer	Asthma und Allergien	TFG-β	Hobbs, et al., 1998
	facioscapulohumerale muskuläre Dystrophie	4q35 Gen	Gabellini, et al., 2002
Insulator	Beckmann-Wiedemann Syndrom	H19/Igf	Prawitt, et al., 2005

2.1.1 *cis*-regulatorische Elemente

In Eukaryoten wird die Expression Protein-kodierender Gene im Wesentlichen durch 2 Gruppen regulatorischer Elemente bestimmt. (i) Proximalen Sequenzen bestehen aus dem Kernpromotor und naheliegenden regulatorischen Elementen. Sie sind direkt an der Transkriptionsstartseite (TSS) lokalisiert. (ii) Distale regulatorische Elemente, wie z.B. Silencer, Enhancer und Insulatoren können hingegen mehrere 100kb entfernt positioniert sein (Maston, et al., 2006) (Abbildung 2, 3).

Die verschiedenen regulatorischen Elemente haben unterschiedliche Funktionen, die sich nicht immer klar trennen lassen.

2.1.1.1 Promotor

Der Promotor eines Gens besteht aus 2 Bereichen. Der Kernpromotor definiert die TSS und gibt die Transkriptionsrichtung vor (Smale, et al, 2003). Die basale Transkriptionsmaschinerie, hauptsächlich bestehend aus den generellen Transkriptionsfaktoren der TF-II Familie, bindet den Kernpromotor und dirigiert so die RNA-Polymerase II zur Transkriptionsstartseite (TSS) (Orphanides, et al., 1996). Gershenzon, et al., (2005) konnten zeigen, dass die Nukleotidsequenz der Kernpromotoren wesentlich unterschiedlicher ist, als bisher angenommen. Nur ca. $\frac{1}{8}$ aller Kernpromotoren weisen eine TATA-Box auf. Auch andere Elemente wie z.B. die TFII-B Bindestellen kommen nur in $\frac{1}{4}$ aller analysierten Promotoren vor. Die genauen Mechanismen, die zur spezifischen Bindung der basalen Transkriptionsmaschinerie an den Promotor führen, sind noch lange nicht aufgeklärt. Der proximale Promotor schließt sich unmittelbar an den Kernpromotor eines Gens an und enthält multiple Bindestellen für Transkriptionsfaktoren. Diese Region kann bis zu mehrere 100bp betragen und scheint Enhancer funktional sehr ähnlich zu sein.

2.1.1.2 Enhancer

Enhancer steuern die Expression zugehöriger Gene in einer räumlich und zeitlich abhängigen Art und Weise (Abbildung 2, 3). In der Regel sind sie modular aufgebaut, sodass ein Promotor zeitlich und räumlich von verschiedenen Enhancer genutzt werden kann (Atchinson, et al., 1988). Enhancer aktivieren unabhängig von Entfernung oder Orientierung den jeweiligen Promotor. Durch meist mehrere Bindestellen für diverse Transkriptionsfaktoren sind sie in der Lage, die Genexpression zu beein-

flussen. Im Gegensatz zu Promotoren sind Enhancer regulatorische Elemente, die über lange Distanzen wirken und mehrere 100 kb entfernt lokalisiert sein können (Blackwood, et al., 1998). Das zurzeit favorisierte Modell bringt Promotor und Enhancer durch Schleifenbildung der DNA in räumliche Nähe zueinander (Abbildung 2) und erst dadurch kann eine exakte Expression des zugehörigen Genes ermöglicht werden (Vilar, et al., 2005; Sen, et al., 2010). Durch die Schleifenbildung werden die DNA-bindenden Proteine zum Promotor geführt und erst dadurch ist der Promotor in der Lage, die Transkription zu initiieren. In einem alternativen Modell erhöht die Anwesenheit eines Enhancers die Chance des Promotors, transkriptionell aktiv zu werden. (Walters, et al., 1995; Fiering, et al., 2000). In Abwesenheit des Enhancers sind in einer Zellpopulation weniger Promotoren in der Lage, transkriptionell aktiv zu werden. Dieses Modell setzt allerdings Promotoren voraus, die stark genug sind, die Transkription vollständig alleine zu initiieren. Enhancer erhöhen die Stabilität der Transkriptionsmaschinerie. Eine genaue Unterscheidung der Modelle kann allerdings nur auf Einzelzellebene erfolgen.

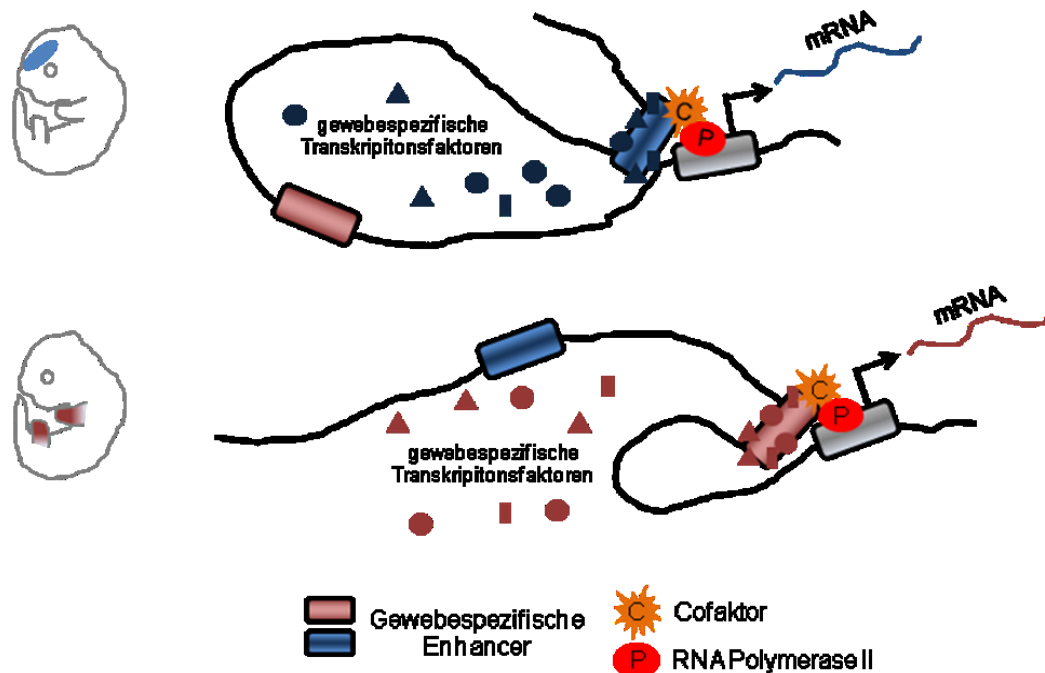


Abbildung 2: Model zur gewebespezifischen Expression eines Gens mittels verschiedener *cis*-regulatorischer Elemente

Gewebe-spezifische Enhancer werden durch Gewebe-spezifische Transkriptionsfaktoren gebunden und rekrutieren diese zum Promotor. Adaptiert von (Maston, et al., 2006).

2.1.1.3 Silencer

Silencer reprimieren die Transkription zugehöriger Gene (Abbildung 3). Sie teilen viele Eigenschaften mit Enhancern und sind in der Regel ebenfalls orientierungs- und entfernungsunabhängig (Ogbourne, et al., 1998). Auch Silencer enthalten Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, die meist einen negativen Effekt auf die Genexpression haben. Die Funktionsweise von Silencern ist in verschiedenen Modellen beschrieben worden. Harris, et al., (2005) und Li, et al., (2004) beschreiben die Funktion von Silencern mit der Blockierung der Bindung nahe gelegener Aktivatoren oder durch die direkte Konkurrenz der Bindung von Transkriptionsfaktoren mittels Anbieten derselben Bindestellen. Srinivasan und Atchinson (2004) beschreiben

die Silencer-abhängige Etablierung eines repressiven Chromatinstatus durch die Modifizierung von Histonen. Eine weitere Möglichkeit stellt die Transkription nicht-kodierender RNA's von Silencern dar (Huttenhoffer, et al., 2005). Z.B. können Polycomb-Response-Elemente (PRE) ihren Status durch ein Aktivierungssignal von Repressoren zu Aktivatoren wechseln. Dieser Statuswechsel erfordert laut Schmitt, et al., (2005) unbedingt die Transkription nicht-kodierender RNA's von den PRE's.

2.1.1.4 Insulator

Durch Partitionieren des Genoms in distinkte Bereiche der Expression definieren Insulatoren Domänen transkriptioneller Aktivität (Maston, et al., 2006) (Abbildung 3). Sie schützen zugehörige Gene vor einer Beeinträchtigung durch transkriptionelle Aktivität benachbarter Gene. Entweder blockieren sie die Interaktion zwischen Enhancer und Promotor oder verhindern die Ausbreitung repressiven Chromatins (Recillas-Targa, et al., 2004). Insulatoren funktionieren im Gegensatz zu Enhancern und Silencern in der Regel in positions- und orientierungsabhängiger Art und Weise (Maston, et al., 2006). Fourel, et al., (2004) beschreibt Insulatoren allerdings nur in Regionen mit hoher Dichte an kodierenden oder regulatorischen Informationen. In weniger dichten Regionen scheinen diese Grenzen eher fließend und nicht durch Insulatoren definiert. Detaillierte Wirkmechanismen von Insulatoren sind zurzeit nicht bekannt, Capelson, et al., (2004) beschreibt aber 2 grobe Kategorien. Zum einen werden Insulatoren direkt mit der transkriptionellen Maschinerie gekoppelt. Durch Rekrutieren von histonmodifizierenden oder genaktivierenden Faktoren schaffen Insulatoren einen lokal aktiven, von repressivem Chromatin abgegrenzten Bereich. Zum anderen greifen Insulatoren in die strukturelle Organisation des Chromatins ein. Mehrere Insulatoren interagieren direkt miteinander oder mit der Kernanlagerungsmatrix und schaffen DNA-Schleifen mit strukturell

unabhängigen Domänen. Dies könnte z.B. die Interaktion von Enhancern und Promotoren beeinträchtigen.

2.1.1.5 Lokus-Kontroll-Region (LCR)

LCR's sind Gruppen regulatorischer Elemente, die einen Locus oder ganze Gengruppen regulieren (Abbildung 3). Positionsunabhängig ermöglichen sie die physiologische und gewebespezifische Expression eines gekoppelten Transgens (Li, et al., 2002). LCR's bestehen aus mehreren *cis*-regulatorischen Elementen (Tanimoto, et al., 1999). Mehrere Studien belegen die Wirkung von LCR's über große Distanzen (Li, et al., 2002). Arbeiten am β -Globin- (Bank, et al., 2006) und Tyrosin-Hydroxylase2-Lokus (Spilianakis, et al., 2005) lassen den gleichen Wirkmechanismus wie bei Enhancern durch DNA-Schleifenbildung vermuten.

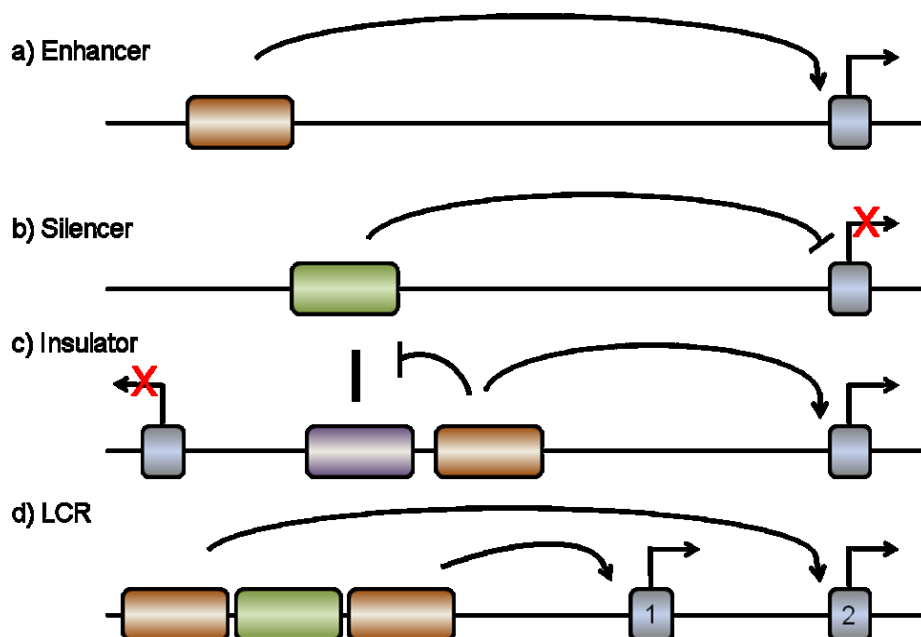


Abbildung 3: Distale *cis*-regulatorische Elemente.

(a, b) Enhancer und Silencer aktivieren und reprimieren die Transkription. (c) Insulatoren blockieren Gene vor der Beeinträchtigung durch regulatorische Elemente benachbarter Gene. (d) LCR bestehen aus mehreren *cis*-regulatorischen Elementen. Adaptiert von (Maston, et. al., 2006).

Erst die Gesamtheit aller *cis*-regulatorischer Elemente integriert unterschiedliche Signale verschiedener Signalwege und ermöglicht eine gewebs- und entwicklungsspezifische Expression der Gene (Abbildung 3).

2.1.2 Transkriptionsfaktoren

Aufgrund ihrer Fähigkeit DNA zu binden und die Expression von Genen zu beeinflussen, spielen Transkriptionsfaktoren eine entscheidende Rolle in allen biologischen Prozessen, wie Zellzyklus (Simon, et al., 2001; Dynlacht, et al., 1997), Stoffwechsel (Accili, et al., 2004), Differenzierung und Entwicklung (Bain, et al., 1994). Sie sind die Schlüsselkomponenten der Genexpression. Ca. 10% aller humanen Proteine fallen in die Gruppe der Transkriptionsfaktoren (Brivanlou, et al., 2002). Abbildung 4 gibt einen Überblick über eine denkbare Einteilung positiv regulierender Transkriptionsfaktoren in verschiedene Gruppen aufgrund ihrer biologischen Funktion.

Transkriptionsfaktoren sind überrepräsentiert unter den Onkogenen (Furney, et al., 2006) und für $\frac{1}{3}$ aller entwicklungsspezifischen Krankheiten verantwortlich (Boyadjiev, et al., 2000). Vaquerizas, et al., (2009) identifiziert 164 Transkriptionsfaktoren, die direkt für 277 bekannte Syndrome und Krankheiten verantwortlich sind. Obwohl Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle spielen, ist über deren Regulation wenig bekannt. Zu vielen Transkriptionsfaktoren sind die regulatorischen Sequenzen nicht vollständig aufgeklärt (Vaquerizas, et al., 2009).

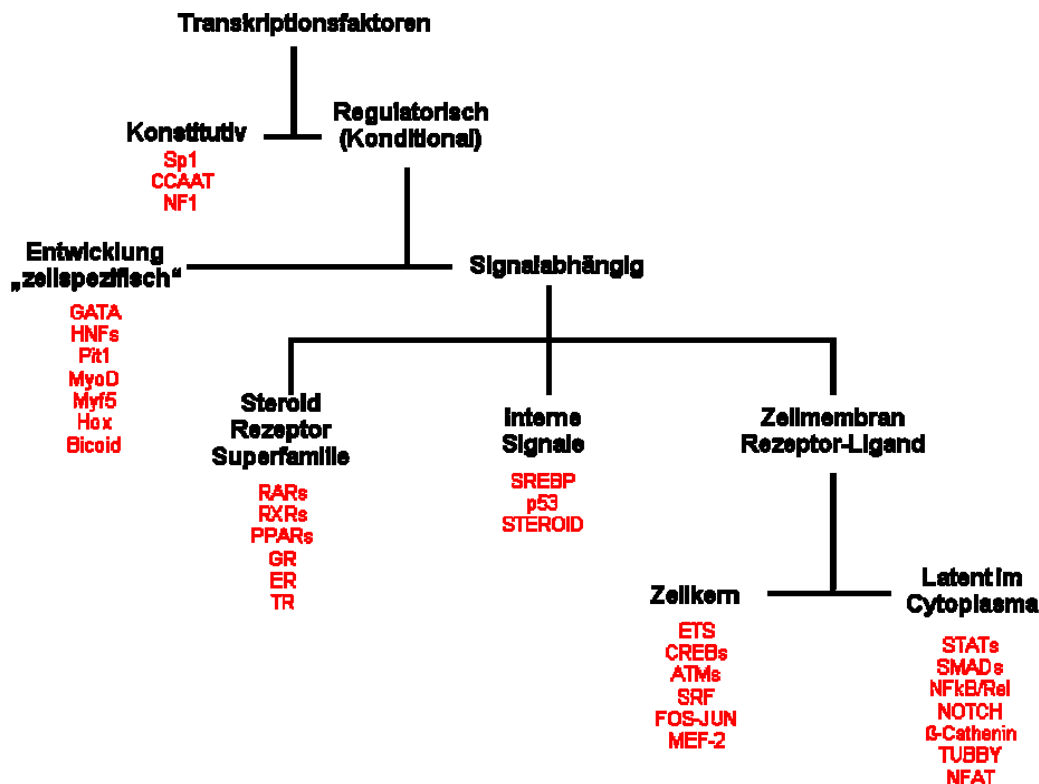


Abbildung 4: Funktionale Klassifikation positiv-aktivierender Transkriptionsfaktoren.

Hauptgruppen sind in schwarz dargestellt. Spezifische Beispiele sind in Rot dargestellt. Die Liste der Beispiele ist nicht vollständig. Abbildung adaptiert von (Brivanlou, et al., 2002).

2.2 Hämatopoiese

2.2.1 Aufbau des hämatopoietischen Systems

Hämatopoiese ist die Bildung und Entwicklung von Blutzellen und einigen anderen Zelltypen, wie z.B. Osteoklasten. Fast alle Blutzellen haben nur eine begrenzte Lebensdauer, die von nur wenigen Stunden (Granulozyten) bis zu einigen Monaten (Erythrozyten) reicht. Die Blutbildung ist ein kontinuierlicher Prozess über die gesamte Lebensspanne hinweg, der hierarchisch organisiert ist. Während dieses Prozesses werden täglich ca. 1×10^{12} Zellen gebildet (Ogawa, et al., 1993). Aus der sich ständig selbst-

erneuernden hämatopoietische Stammzelle (HSC) werden kontinuierlich über verschiedene Vorläuferstadien ausgereifte Zellen gebildet, die verschiedenartige Funktionen erfüllen (Abbildung 5). Die Leukozyten, wie B-Zellen, T-Zellen, Makrophagen, Granulozyten, dendritische Zellen und Mastzellen bilden das Immunsystem und schützen den Körper gegen Infektionen (Orkin, et al., 2008). Erythrozyten transportieren den eingeatmeten Sauerstoff in jede Region des Körpers (Richards, et al., 1998), während Thrombozyten bei der Blutgerinnung eine entscheidende Rolle spielen (Eitzman, et al., 1994).

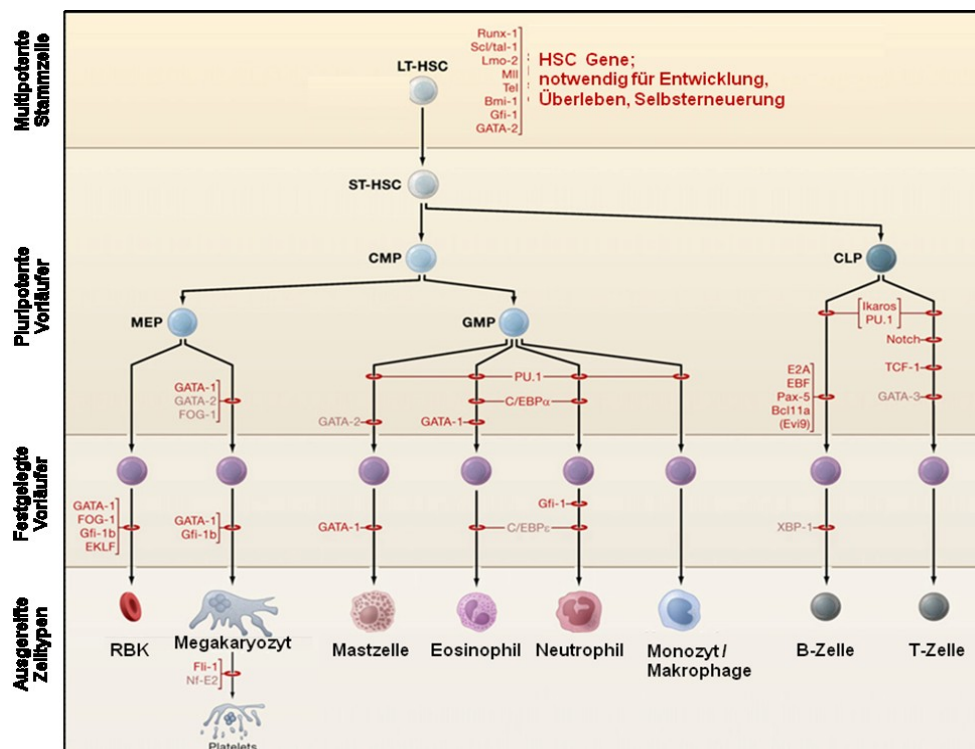


Abbildung 5: : Aufbau des hämatopoietischen Systems mit notwendigen Transkriptionsfaktoren zur Differenzierung.

Gezeigt ist der vereinfachte hierarchische Aufbau des hämatopoietischen Systems von der Langzeitstammzelle (LT-HSC) über die Kurzzeitstammzelle (ST-HSC) über verschiedene Vorläuferstadien (CMP–allgemeiner myeloischer Vorläufer; MEP- megakaryozytärer/erythroider Vorläufer; GMP- granulozytärer/monozytärer Vorläufer; CLP- allgemeiner lymphoide Vorläufer) hin zu ausdifferenzierten Zellen, .z.B. B-Zellen oder Erythrozyten (RBK). Die Stadien eines Differenzierungsblocks durch Verlust des angezeigten Transkriptionsfaktors sind durch rote Balken markiert. Adaptiert von (Orkin, et al., 2008)

Erkrankungen des Blutsystems sind eines der zentralen Untersuchungsobjekte der Medizin. Dadurch hat sich das hämatopoietische System in den letzten Jahrzehnten als Modellsystem für Organentwicklung etabliert. Auf Grund des hohen Konservierungsgrades in Aufbau und Funktion, als der Schwierigkeiten mit humanem Material zu arbeiten, werden Mausmodelle in großem Umfang benutzt. Diese Arbeit basiert auf Erkenntnissen aus Untersuchungen des murinen Blutsystems. Dies bietet zahlreiche Vorteile. Es ist relativ leicht, hämatopoietische Zellen zu isolieren. Die Zellen werden zudem in unterschiedlichsten Organen wie Knochenmark, Milz oder Thymus gefunden. Ein weiter großer Vorteil ist, dass mittels dem Fluoreszenz-aktiviertem Sortieren von Zellen eine Möglichkeit zur Verfügung steht, Zellen an Hand ihrer Oberflächenmarker sehr genau zu bestimmen. So ist bereits eine Vielzahl der unterschiedlichen Zelltypen des hämatopoietischen Systems an Hand ihrer Oberflächenmoleküle sehr detailliert beschrieben worden.

2.2.2 Transkriptionsfaktoren in der Hämatopoiese

Hämatopoietische Transkriptionsfaktoren sind intrinsische Determinanten des zellulären Phänotyps. In der B-Zellentwicklung sind z.B. Pax 5 und EBF1 unabdingbar für eine vollständige Zellreifung (Lin, et al., 1995; Nutt, et al., 1999). Ein eindrucksvoller Beweis der zelltypbestimmenden Funktion von Transkriptionsfaktoren ist die Überexpression von C/EBP α in B-Zellen. Sie führt zur Reprogrammierung und Transdifferenzierung in Makrophagen (Bussman, et al., 2009). Abbildung 5 zeigt die Notwendigkeit verschiedener Transkriptionsfaktoren zur Bildung unterschiedlicher Zelltypen. Bei der Definition eines Zelltyps kombinieren Transkriptionsfaktoren meist aktivatorische und repressorische Funktionen (Orkin, et al., 2008). Ihre Funktion ist immer eingebettet in ein komplexes Netzwerk aus Interaktionen mit anderen Faktoren. GATA1 und PU.1 sind Antagonisten während der Differenzierung megakaryozytärer/erythroider und myeloischer

Zelltypen (Galloway, et al., 2005; Rhodes, et al., 2005). PU.1 und Gfi1 hingegen haben antagonistische Wirkungen in der myeloischen und neutrophilen Entwicklung (Dahl, et al., 2007).

Der Verlust eines wichtigen Transkriptionsfaktors oder dessen Deregulierung kann zu schweren Defekten in der Entwicklung des hämatopoietischen Systems und damit zu Leukämie führen. Z.B. wurde in 50% aller humanen T-Linien akuter lymphatischer Leukämie (T-ALL) Fällen eine aktivierende NOTCH1 Mutation nachgewiesen (Ferrando, et al., 2009). Auch in Mäusen wird durch NOTCH1 Überexpression T-ALL induziert (Aster, et al., 2000). Dies zeigt die Notwendigkeit, Transkriptionsfaktoren und deren Regulation genau zu verstehen

2.3 Ets-Transkriptionsfaktoren

Eine der größten Familien von Transkriptionsfaktoren spezifisch für Metazoen sind die Ets-Faktoren. Vermutlich spielen sie nur in Regulationskaskaden der Metazoen eine Rolle. Nunn und Leprince (1983) haben Ets-1 als erstes Familienmitglied beschrieben. Auf Grund der Homologie zur Ets-DNA-Bindedomäne sind in den folgenden Jahren eine Menge weiterer Familienmitglieder in verschiedenen Spezies beschrieben worden. Die Ets-Domäne besteht aus 85 Aminosäuren, die Purine-reiche DNA mit einem zentralen GGAA/T Motiv bindet (Graves, et al., 1998). Auf Grund funktioneller und struktureller Ähnlichkeiten werden die Ets-Transkriptionsfaktoren in mehrere Unterfamilien eingeteilt (Abbildung 6).

Untergruppe (Beispiele)

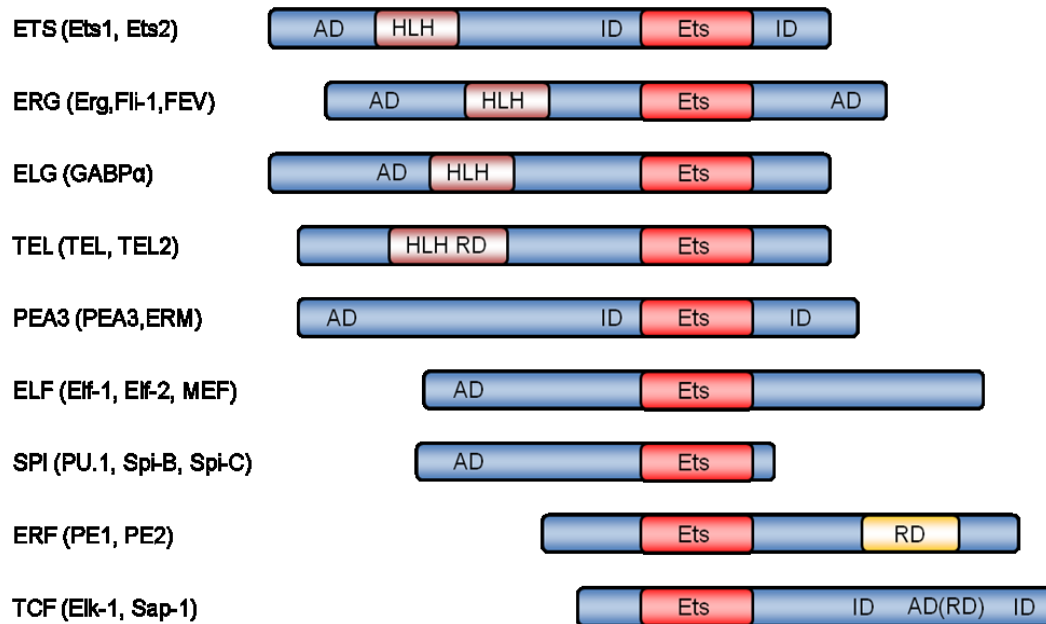


Abbildung 6: Struktur und Einteilung in Untergruppen der Ets-Transkriptionsfaktoren.

Ets: DNA-Bindedomäne, HLH: Helix-Loop-Helix-Domäne, AD: Aktivierungsdomäne, ID: autoinhibitorische Domäne, RD: repressorische Domäne. Adaptiert von (Oikawa, et. al., 2003)

Ets-Faktoren haben Funktionen in allen wichtigen zellulären Prozessen. Treisman (1994) beschreibt die Rolle der TCF-Untergruppe in der Proliferation. Ets 2 inhibiert die Apoptose (Sevillia, et al., 1999) und für PEA3 konnte die Förderung der Differenzierung gezeigt werden (Taylor, et al., 1997).

2.3.1 Ets-Faktoren und Krebs

In den vergangenen Jahren wurde für viele ETS-Faktoren ein Zusammenhang mit Krebs gezeigt (Abbildung 7). So führt die Expression des Fusionsproteins Fli1/EWS zum Ewing Sarkom (Delattre, et al., 1992). Tel-Fusionsproteine haben einen entscheidenden Anteil an der Pathologie von

akuten myeloischen oder lymphatischen Leukämien (AML, ALL) (Mavrothalassitis, et al., 2000). Auch in Prostata-, Lungen- und Brustkrebs scheinen Ets-Transkriptionsfaktoren eine entscheidende Rolle zu spielen (Seth, et al., 2005).

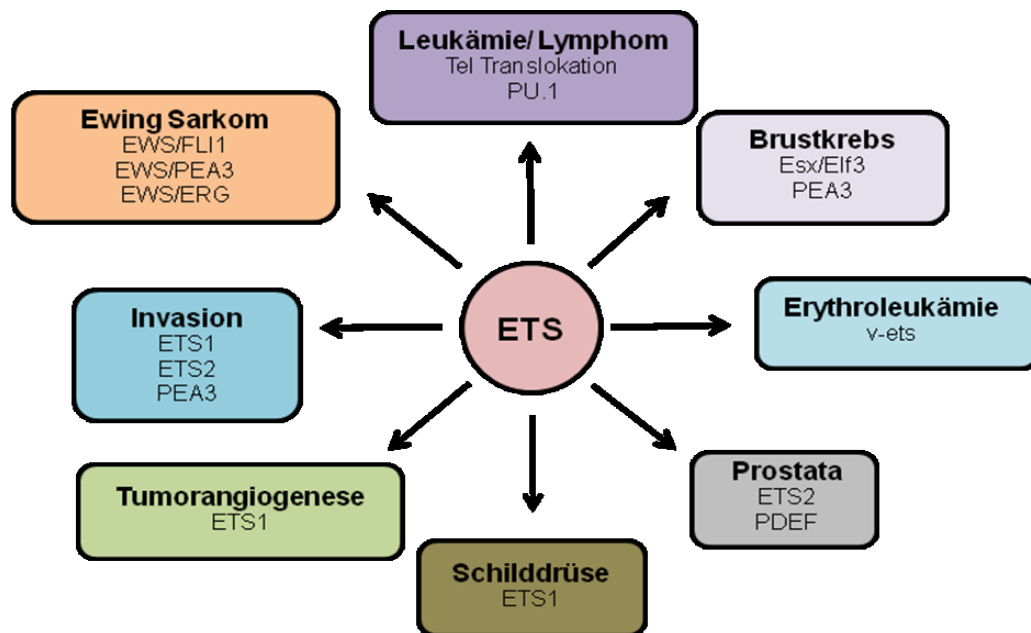


Abbildung 7: Ets-Faktoren und Krebs.

Adaptiert von (Seth, et al., 2005).

Ca. $\frac{1}{3}$ aller ETS-Faktoren sind in die Regulation von Genen des Immunsystems und der Hämatopoiese involviert (Gallant, et al., 2006). Als einer der wichtigsten und am besten untersuchtesten ETS-Faktoren des hämatopoietischen Systems gilt PU.1.

2.4 PU.1

Als zentraler Regulator des hämatopoietischen Systems ist PU.1 ausschließlich im hämatopoietischen System exprimiert. PU.1 hat allein in Makrophagen über 1000 Zielgene (Weigelt, et al., 2009). PU.1 ist essentiell für die Erhaltung der HSC, der B- und T-Zell Entwicklung und der termi-

nen myeloischen Differenzierung. Der Verlust von PU.1 führt konsequenter Weise zum pränatalen oder postnatalen Tod von Mäusen (Scott, et al., 1994; McKercher, et al., 1996). Die Mäuse haben eine anormale Hämatopoiese mit dem Verlust aller myeloischen und B-lymphoiden Zellen.

2.4.1 PU.1 und Pathologie

1988 wurde PU.1 von Moreau-Gachelin als Ziel einer Virusinsertion identifiziert, die zu erythroider Leukämie führt. Die Überexpression von PU.1 in erythroiden Vorläufern führt zu einem Differenzierungsblock und anschließendem Herauswachsen erythroider Blasten (Moreau-Gachlin, et al., 1990, 1996). Die Unterstützung der Selbsterneuerung und Verhinderung der terminalen Differenzierung durch PU.1 in erythroiden Vorläufern könnte das onkogene Potential erklären. (Back, et al., 2004; Pop, et al., 2010) Erythroide Leukämien sind im Menschen jedoch sehr selten und eine Verbindung mit PU.1 konnte bisher nicht nachgewiesen werden.

In myeloischen Zellen fungiert PU.1 als Tumorsuppressor. Durch γ -Strahlung induzierte myeloische Leukämien weisen häufig nicht funktionelles PU.1 auf (Cook, et al., 2004). Durch haploide Deletion von PU.1 in PML-RAR exprimierenden transgenen Mäusen wird die Wahrscheinlichkeit für Leukämien stark erhöht (Walter, et al., 2005). Sowohl die Reduktion der PU.1 Expression durch den Verlust regulatorischer Sequenzen als auch der komplette Verlust der PU.1 Expression durch Exzision in adulten Mäusen führt innerhalb weniger Monate zu myeloischen Leukämien (Rosenbauer, et al., 2004; Metcalf, et al., 2006). In der Pathologie PML-RAR und AML-ETO induzierter humaner AMLs spielt die Inhibition der PU.1 Expression und der Proteinfunktion eine entscheidende Rolle (Müller, et al., 2002; Vangala, et al., 2003; Müller, et al., 2006). PU.1 scheint also eine entscheidende Rolle in der Entwicklung myeloischer Leukämien zu haben.

Studien mit Mäusen, denen regulatorische Sequenzen von PU.1 fehlen, zeigen die Entwicklung von T-Zell-Leukämien (Rosenbauer, et al., 2006). Dies könnte mit der fehlenden Möglichkeit der PU.1 Expressionsreduzierung in T-Zell-Vorläufern in Zusammenhang stehen. Ob PU.1 ähnliche Funktionen wie in erythroiden Vorläufern hat und die Deregulation von PU.1 eine Rolle in der Entstehung humaner T-Zell-Leukämien spielt, ist derzeit unbekannt.

Die fehlerhafte Regulierung von PU.1 führt zu Defekten diverser hämatopoietischen Linien. Tabelle 2 gibt eine Übersicht, über die verschiedenen PU.1 Mausmodelle und den daraus resultierenden Entwicklungsdefekten.

Tabelle 2: Überblick über publizierte PU.1 Mausmodelle.

Angezeigt sind die Art der Mutation und deren Effekt auf die Zellen des hämatopoietischen Systems. Adaptiert von (Dekoter, et al., 2005)

Mutationsart		Phänotyp	Referenz
Überexpression	PU.1 Transgen von LTR des SFFV Virus gesteuert	erythroide Leukämie	Moreau-Gachelin, et al., 1996
Null Allel	Insertion von Neomycinkassette in Exon 5 zerstört ETS-Domäne	Verlust fötaler B-, T- und myeloischer Zeller, später fötaler/neonathaler lethal	Scott, et al., 1994; McKercher, et al., 1996
	Insertion von GFP-Reporter in Exon 1	Verlust fötaler B- und myeloischer Zellen, abnormale Erythropoiese; neonatal lethal	Back, et al., 2004
	Deletion Exon 5	Verlust fötaler und myeloischer Zellen; neonatal lethal	Dakic, et al., 2005
	Deletion Exon 4+5	Verlust fötaler Gr1+Mac1+ und CD19+ Zellen; keine identifizierbaren Vorläufer in fötaler Leber	Iwasaki, et al., 2005 und Ye, et al., 2005

B-zellspezifische Deletion	Deletion Exon 5 mit CD19-Cre	Entwicklung funktionaler B-Zellen	Polli, et al., 2005,
	Deletion Exon 4+5 mit CD19-Cre	keinen Effekt (Iwasaki) ; progressive Expansion von B1 Zellen (Ye)	Iwasaki, et al., 2005 und Ye, et al., 2005
induzierbare Deletion	PolyIC-induzierte Deletion Exon 5 mit MxCre	granulozytäre Expansion und myeloische Leukämie	Dakic, et al., 2005; Metcalf, et al., 2006
	PolyIC-induzierte Deletion Exon 4+5 mit MxCre	progressiver Verlust von HSC und aller Vorläufer	Iwasaki, et al., 2005
URE Deletion	Deletion cis-regulatorischen Elementes -14kb von der TSS (mit Neomycin-kassette)	myeloische Leukämie	Rosenbauer, et al., 2004
	Deletion cis-regulatorischen Elementes -14kb von der TSS (ohne Neomycin-kassette)	Block der T- und B-Zellentwicklung; Expansion von B1 Zellen, myeloische Leukämie	Rosenbauer, et al., 2006

2.4.2 Expression von PU.1

Die vielfältigen Funktionen von PU.1 werden durch ein komplexes und dynamisches Expressionsmuster reflektiert (Abbildung 7). Mehrere GFP-Mausmodelle geben detaillierten Aufschluss über die Expression von PU.1 in den verschiedenen Zellen des hämatopoietischen Systems (Back, et al., 2004, Nutt, et al., 2005). Eine hohe PU.1 Expression findet sich in der HSC sowie den lymphoiden, myeloisch/granulozytären und frühen thymischen Vorläufern. Erythroide/megakaryozytäre Vorläufer exprimieren PU.1 nur in der fötalen Leber auf hohem Level, im adulten Knochenmark hingegen nur auf niedrigem Niveau. In differenzierten Zellen wird PU.1 am stärksten in Granulozyten und Makrophagen exprimiert. B-Zellen exprimieren PU.1 eher auf einem mittleren Niveau. In T- (außer eine kleine T-Helfer-Zelle 2 Untergruppe) und Natürlichen-Killer-Zellen, sowie Erythrozyten und Megakaryozyten wird PU.1 nicht mehr exprimiert.

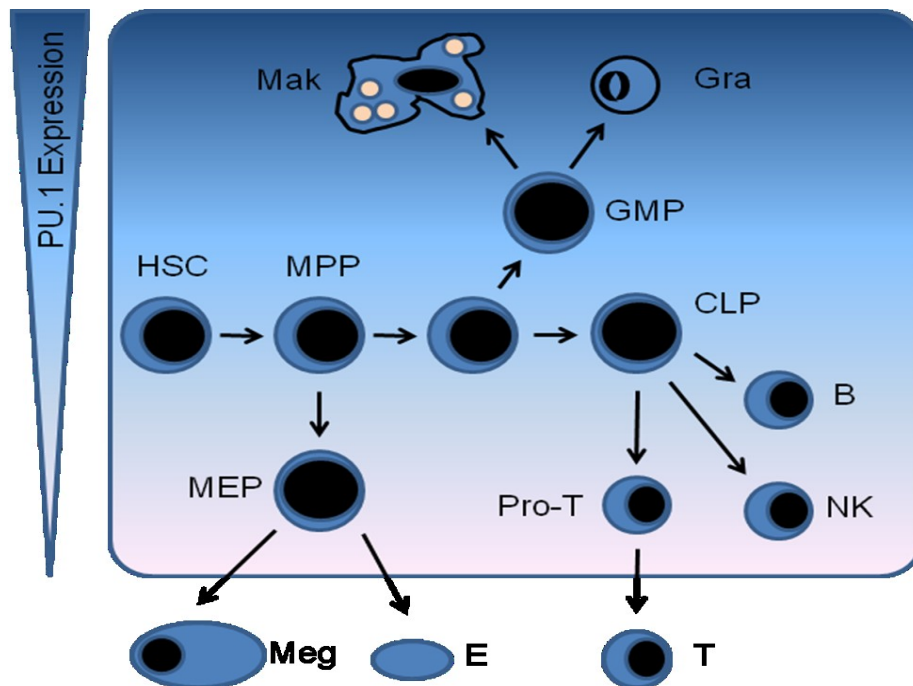


Abbildung 8: Model der PU.1 Expression in Zelltypen des hämatopoietischen Systems.

PU.1 Konzentration ist angezeigt durch Farbgradient von blau (stark) zu weiß (schwach). Die Position der Zellen im Gradienten spiegelt die Stärke der PU.1 Expression wieder. Zellen außerhalb des Gradienten exprimieren kein PU.1. MPP: multipotenter Vorläufer; LMPP: lymphoid-geprägter Vorläufer; Mak: Makrophage; Gra: Granulozyte; B: B-Zelle; NK: natürliche Killerzelle; Pro-T: Vorläufer T Zelle; T: T-Zelle; Meg: Megakaryozyt; E: Erythrozyt. Adaptiert von (Dekoter, et al., 2007)

Neben der Höhe der PU.1 Expression in den verschiedenen Zelltypen scheint auch der Zeitpunkt der Anpassung des Expressionslevels eine entscheidende Rolle in der Differenzierung zu spielen. Pop, et. al., (2010) konnten zeigen, dass die PU.1 Reprimierung während Differenzierung der Erythrozyten nur zu einem bestimmten Zeitpunkt die Zellen vom Zellzyklus in die terminale Differenzierung führt.

2.4.3 Regulation

Die Expression und Aktivität von PU.1 muss sehr genau reguliert werden, da bereits kleine Änderungen der Aktivität den Phänotyp der Zelle beeinflussen. PU.1 wird auf posttranslationaler Ebene reguliert. Die Phosphory-

lierung verschiedener Serine beeinflusst die Aktivität von PU.1 genauso, wie die Interaktion mit anderen Faktoren wie z.B. TFIID, C/EBP's, GATA 1 und 2 oder IRF4 und 8. (Laslo, et al., 2010). Auf posttranskriptioneller Ebene wird PU.1 durch microRNA's reguliert. So ist die 3'UTR der PU.1 mRNA Ziel der mir155 und wird durch diese reguliert (Vigorito, et al., 2007). Eine von einem Upstream Regulatory Element (URE) abgelesene antisense RNA eröffnet eine weitere Möglichkeit der PU.1 Regulation (Ebralidze, et al., 2008).

Im Promotor konnten Oct1, SP1, GATA1, SPi-B und PU.1 Bindestellen nachgewiesen werden, was die initiale Regulierung der PU.1 Expression während der frühen hämatopoietischen Entwicklung widerzuspiegeln scheint (Burda, et al., 2010). Li, et. al., (2001) konnten allerdings zeigen, dass der basale PU.1 Promotor in transgenen Mäusen zu schwach ist, um eine physiologisch korrekte PU.1 Expression zu ermöglichen. Die Autoren konnten aber ein *cis*-regulatorisches Element (URE) identifizieren, das -14/-15kb von der TSS entfernt liegt. Die Deletion dieses Elementes in Mäusen führt zu starken Änderungen in der PU.1 Expression (Rosenbauer, et al., 2004). In HSC, B-Zellen und myeloischen Zellen kommt es zu einer Verringerung der PU.1 Expression mit gleichzeitiger Reduktion der Zellzahlen. In T-Zell-Vorläufern hingegen kann PU.1 nicht mehr reprimiert werden. Es kommt zu einem frühen Differenzierungsblock der Zellen und die Tiere entwickeln in 3-8 Monaten eine akute myeloische Leukämie. Durch RUNX1 Bindung an die URE in HSC erfolgt vermutlich die Öffnung des PU.1 Locus während der hämatopoietischen Differenzierung (Burda, et al., 2010). Die URE hat breite Effekte auf alle Zelltypen und kann daher nicht als Erklärung für die stark differenzierten PU.1 Expressionslevel in den verschiedenen Zelltypen herangezogen werden. Welche weiteren regulatorischen Elemente für eine Differenzierung der PU.1 Expression nötig sind, soll in dieser Arbeit geklärt werden.

2.5 Ziele der Arbeit

Die Kontrolle der Genexpression über regulatorische DNA-Sequenzen ist eine der entscheidenden Ursachen für die Komplexität höherer Organismen. Fehlerhafte Expression von Transkriptionsfaktoren gilt als Ursache diverser Krankheiten wie z.B. Entwicklungsstörungen und Leukämien. Deswegen ist es von entscheidender Bedeutung, die Funktion der regulatorischen Sequenzen wichtiger Transkriptionsfaktoren zu kennen. Ziel dieser Arbeit ist die Definition entscheidender regulatorischer Sequenzen des hämatopoietischen Transkriptionsfaktors PU.1 um Mechanismen zur zelltypspezifischen Expression aufzuzeigen. Im Einzelnen sollten dazu folgende Fragen geklärt werden:

- 1.) Was ist die komplette regulatorische Einheit von PU.1?
- 2.) Welche Funktionen haben neue regulatorische Elemente?
- 3.) Wie wird zelltypspezifische PU.1 Expression etabliert?

3 Ergebnisse

Ergebnisse von Kollaborationen werden gesondert gekennzeichnet.

Die Etablierung des transgenen Mausmodells mit dem humanen PU.1 bakteriell-artifiziellem Chromosom (BAC) wurde in Zusammenarbeit mit dem Tierhaus des MDC unter Leitung von Boris Jerichow durchgeführt.

Die Generierung und Analyse der genomweiten DNaseI-Daten in B-Zellen und Makrophagen, als auch der DNaseI footprint wurden in Zusammenarbeit mit Maarten Hoogenkamp, Salem Assi, Constanze Bonifer und David R. Westhead an der Universität Leeds durchgeführt.

Die ChIP-chip-Daten wurden in Zusammenarbeit Nikola K. Wilson und Berthold Göttgens am Cambridge Institute for Medical Research der Universität Cambridge generiert.

Die genomweiten Bindungsdaten und deren Analyse für PU.1 und C/EBP α wurden von Sven Heinz am Department of Cellular and Molecular Medicine der Universität Kalifornien durchgeführt.

Die genomweiten P300 Bindungsdaten wurden von Serena Ghisletti am Department of Experimental Oncology des European Institute of Oncology generiert. Die Analyse erfolgte in Zusammenarbeit mit Wei Chen vom MDC.

3.1 Studien mit transgenem humanem PU.1 BAC Maus Model

3.1.1 Generierung des transgenen Mausmodels

Zur Identifizierung weiterer *cis*-regulatorischer Elemente wurde ein transgenes Mausmodel generiert, welches den humanen PU.1 Lokus auf einem BAC enthält. BACs enthalten komplette genomische Loci. Sie sind sehr gut geeignet, komplexe Interaktionen und Funktionen genomischer Sequenzen zu beschreiben. Das BAC enthält (GenBank Zugangsnummer AC 074195) ~179kb des humanen Chromosoms

11, welches den PU.1 Locus jeweils ~100 kb am 5' und ~50 kb am 3'-Ende flankiert. Auf dem BAC sind zusätzlich die Gene *Rapsn*, *Psmc3*, *Slc39a13* und partiell *Cugbp1* (Exons 9-14) am 5'-Ende des Pu.1 Locus sowie die Gene *Mybpc 3* und partiell *Madd* (Exons 23-26) am 3' Ende lokalisiert. (Abbildung 9)

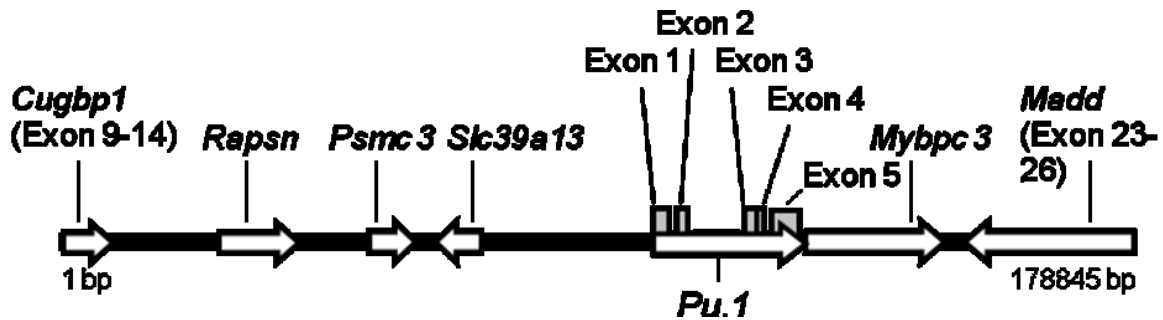


Abbildung 9: Karte des humanen PU.1 BAC-Klons.

Gezeigt ist das Insert des BAC, der die Basen 47.499.973bp – 47.321.096bp des humanen Chromosoms 11 enthält. Offene Pfeile: Position und Orientierung aller Gene, welche auf dem BAC enthalten sind. Graue Boxen: Position der Pu.1 Exons

Auf Grund des hohen Konservierungsgrades zwischen dem humanem und murinem Pu.1 Gen wurde zur Erleichterung der strukturellen Analysen der humane Pu.1 Locus gewählt. Die Integration eines BAC in das Chromosom erfolgt zufällig. Für validierbare Aussagen müssen mehrere transgene Linien analysiert werden, um Positionseffekte durch verschiedene Integrationsorte auszuschließen. Es wurden 2 transgene Mauslinien (#1 und #55) etabliert und die meisten der nachfolgenden Analysen für beide transgenen Mauslinien durchgeführt. Abbildung 10a zeigt sowohl die Lokalisation der für die Charakterisierung der Mausstämmen benutzten Primerpaare, als auch der für die Analyse der Integrität der Kernregion benutzten Restriktionsfragmente. Beide Mauslinien enthalten eine strukturell intakte 40kb große zentrale Region, die den Pu.1 Locus enthält. Während die transgene Mauslinie #55 das BAC komplett integriert hat, fehlt in der Linie #1 ein Teil des 3'-Endes. Die Kopienzahl der BACs in beiden Mauslinien wurde mittels Restriktionsverdau und anschließendem Southern Blot mit einer Sonde, die beide PU.1 Loci bindet, analysiert. Abbildung 10b zeigt das Ergebnis mit anschließender Grauwertquantifizierung. Mauslinie #55 hat 3 Integrate, während Linie #1 nur 2 Integrate hat. Diese Daten konnten durch eine quantitative PCR (qPCR) (Daten nicht gezeigt) bestätigt werden.

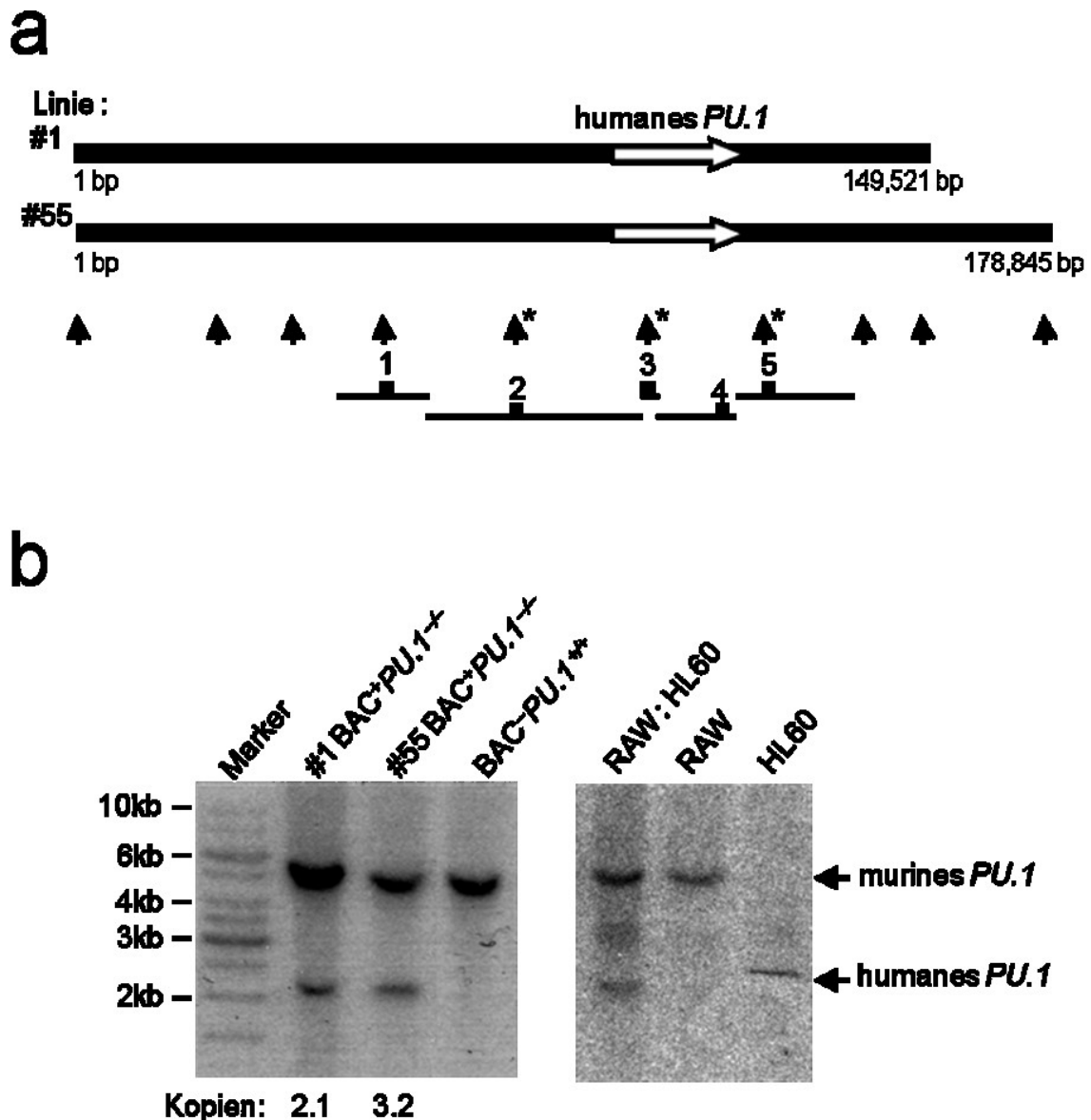


Abbildung 10: Kopienzahl und Integrität der humanen Pu.1 BAC Integration.

(a) Abbildung zeigt die integrierten Fragmente des humanen Chromosoms 11 in beiden transgenen Mauslinien. Offene Pfeile: Position und Orientierung des Pu.1 Gens. Vertikale Pfeile unter der Grafik: Position der genomischen PCR-Amplifikate, welche für die Genotypisierung benutzt worden sind. Sterne markieren Amplifikate, welche für das initiale Identifizieren der transgenen Founder-Mäuse benutzt worden sind. Nummerierte horizontale Linien: *ScaI* Fragmente, um die Integrität des BAC per Southern Blot zu zeigen. Schwarze Boxen markieren die Position der benutzten Southern Blot Sonden. (b) Southern Hybridisierung von *EcoRI* verdauter genomischer DNA von Knochenmark beider transgenen Linien mit entsprechender Kontroll-DNA aus einer nicht-transgenen Maus, sowie aus Zelllinien um die Spezifität der Sonde zu den einzelnen Loci zu bestimmen. Ein 208bp *NotI*-*PstI* Fragment vom 3'-Ende der murinen URE wurde als Sonde benutzt.

3.1.2 Gewebe- und zelltypische Spezifität der Expression des humanen PU.1 BAC

Zur Feststellung einer physiologischen PU.1 Expression durch das BAC wurden beide Mauslinien in einen Pu.1 defizienten Hintergrund verkreuzt (Iwasaki, et. al., 2005). Im PU.1^{-/-} Hintergrund erzeugten beide BAC-Linien vitale Nachkommen, die nicht unterscheidbar waren von wildtypischen Wurfgeschwistern. Beide Mauslinien ergaben eine nach Mendel erwartbare Nachkommensverteilung (Tabelle 3). Die Nachkommen waren fertil, womit der beschriebene spermatogoniale Stammzelldefekt (Olive, et al., 2007) korrigiert wurde.

Tabelle 3: Korrigieren des letalen Pu.1^{-/-} Phänotyps durch transgene Expression des humanen Pu.1.

Genotypisierung der Nachkommen aus Verpaarungen von BAC⁺Pu.1^{+/-} und BAC⁻ Pu.1^{+/-} Eltern wurden analysiert mittels PCR nach der Entwöhnung.

Transgene Linie	Anzahl geborener Mäuse	BAC	murines <i>PU.1</i> Allel		
			+/+	+/-	-/-
#1	137	-	14	37	0
		+	17	50	19
#55	126	-	20	38	0
		+	17	32	19

Mit dem Erhalt von BAC⁺PU.1^{-/-} Tieren beider Linien konnten detaillierte Expressionsanalysen des BACs sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene durchgeführt werden. Verschiedene Gewebe wurden präpariert und Zelltypen des hämatopoietischen Systems sortiert und daraus RNA gewonnen. Nach der reversen Transkription in cDNA wurde durch Spezies-spezifische Primer-Sonden Kombinationen mit gleicher Amplifikationseffizienz (Daten nicht gezeigt) die Expression analysiert. Weder in den verschiedenen Geweben der Tiere noch in den sortierten Zelltypen des hämatopoie-

tischen Systems konnten Unterschiede in der mRNA-Expression von PU.1 zwischen den transgenen und den wildtypischen Tieren gezeigt werden. (Abbildung 11)

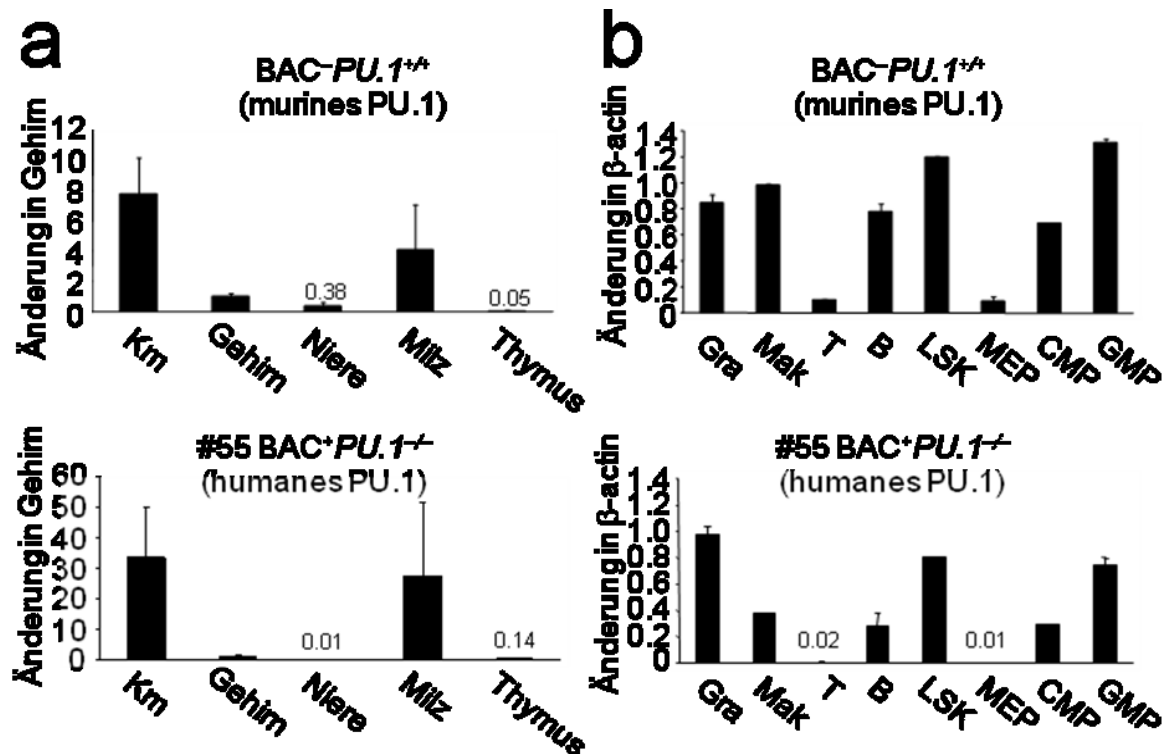


Abbildung 11: Vergleich endogener muriner und transgener humaner PU.1 Transkripte

(a) in verschiedenen Geweben. (b) und hämatopoietischer Zelltypen, isoliert von BAC-PU.1^{+/+} und BAC+PU.1^{-/-} Mäusen der Linie #55. Die gezeigten qPCR Ergebnisse repräsentieren den Durchschnitt + Standardabweichung (SD) von n=3 Mäusen pro Genotyp. Daten wurden normalisiert zur β-Actin Expression. Knochenmark = BM; Granulozyten (Gra: Gr1+CD11b+CD19-CD3-), Makrophagen (Mak: CD11b+Gr1-CD19-CD3-), T-Zellen (T: CD3+CD19-Gr1-CD11b-) und B-Zellen (CD19+CD3-Gr1-CD11b-) wurden aus der Milz sortiert. LSK-Zellen (Lin-Sca-1+c-kit+), megakaryozytärer Vorläufer (MEP: lin-Sca-1-c-kit+CD34+FcyRII/III-), allgemeiner myeloischer Vorläufer (CMP: lin-Sca-1-c-kit+CD34+FcyRII/IIIlow) und granulozytärer myeloischer Vorläufer (GMP: lin-Sca-1-c-kit+CD34+FcyRII/III+) wurden aus dem Knochenmark isoliert.

Die Analyse der Proteinexpression erfolgte in verschiedenen Zelltypen hämatopoietischer Organe. Aus verschiedenen Organen und vorher gereinigten Zellpopulationen wurde Protein isoliert und anschließend im Western Blot analysiert. Abbildung 12 zeigt im Proteingehalt diverser Zelltypen keine erkennbaren Unterschiede zwischen transgenen und Kontrollmäusen.

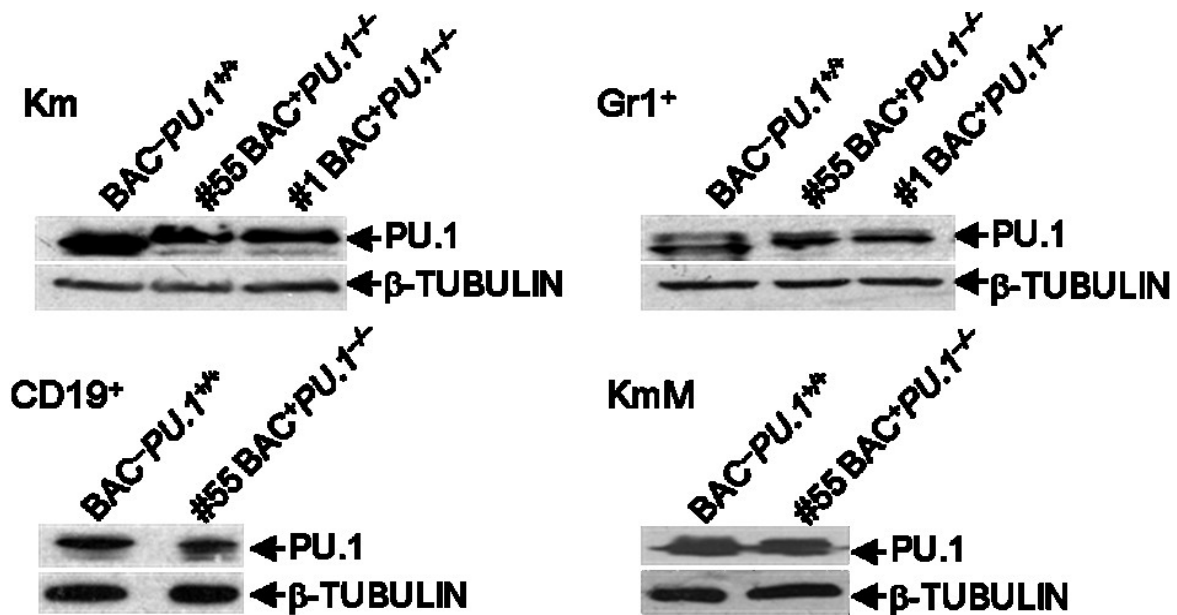


Abbildung 12: Western Blot Analyse des humanen PU.1 Proteins in verschiedenen Geweben.

Km = Knochenmark, Gr1 = Gr1+ angereicherte Knochenmarkszellen, CD19+ = CD19+ angereicherte Milzzellen, KmM = aus dem Knochenmark generierte Makrophagen

3.1.3 Das humane PU.1 BAC führt zur Wiederherstellung der Hämatopoiese in PU.1^{-/-} Mäusen

Einer der auffälligsten Defekte in Pu.1 defizienten Mäusen ist das Fehlen ausgereifter myeloischer und B-lymphoider Zellen. Die Analyse des peripheren Blutes ist in Tabelle 4 gezeigt. Im Blutbild sind alle hämatopoietischen Zellpopulationen vorhanden. Deren Verteilung lässt keine Unterscheidung zwischen den einzelnen Mauslinien zu.

Tabelle 4: BAC⁺PU.1^{-/-} Mäuse zeigen normales Blutbild des peripheren Blutes.

Blut wurde von altersangeglichenen Mäusen (12-16 Wochen) aus der Schwanzvene genommen. Werte sind Durchschnittswerte mit Standardabweichung des angegebenen Genotyps. n = 5

Blut	BAC ⁻ PU.1 ^{+/+} #1	BAC ⁺ PU.1 ⁻ #55	BAC ⁺ PU.1 ^{-/-}
Weißer Blutkörper x10 ³ /mm ³	13.06 ± 1.95	10.78 ± 1.26	10.5 ± 1.33
Rote Blutkörper x10 ⁶ /mm ³	12.44 ± 0.76	13.72 ± 4.44	15.1 ± 1.26
Hämoglobin, g/dL	16.5 ± 0.81	19.2 ± 5.93	10.75 ± 1.73
Lymphozyten %	72.76 ± 4.88	80 ± 3.25	79.4 ± 4.28
Granulozyten %	19.66 ± 4.34	13.62 ± 2.9	15.42 ± 3.9
Monozyten %	7.78 ± 0.93	6.42 ± 1.39	5.66 ± 1.23

Die Analyse mittels Blutzähler bleibt allerdings ungenau und lässt nur eine grobe Einteilung in verschiedenen Zelltypen des hämatopoietischen Systems zu. Die verschiedenen Zelltypen hämatopoietischer Organe wurden mittels Fluoreszenz-gekoppelter Durchflußzytometrie genauer identifiziert. Während die Vorläuferpopulationen im Knochenmark untersucht worden sind, wurden die ausdifferenzierten Zelltypen in der Milz analysiert. Anzahl und Verteilung von Monozyten, Granulozyten, B-Zellen und T-Zellen in der Milz waren zwischen den BAC⁺PU.1^{-/-} und den BAC⁻PU.1^{+/+} Mäusen nicht unterscheidbar. (Abbildung 13a). Auch myeloische und megakaryozytäre-erythroide Vorläufer im Knochenmark waren in gleicher Frequenz und Anzahl vorhanden. (Abbildung 13c) Die Überprüfung der absoluten Zellzahlen ergab keine signifikanten Unterschiede. (Abbildung 13b)

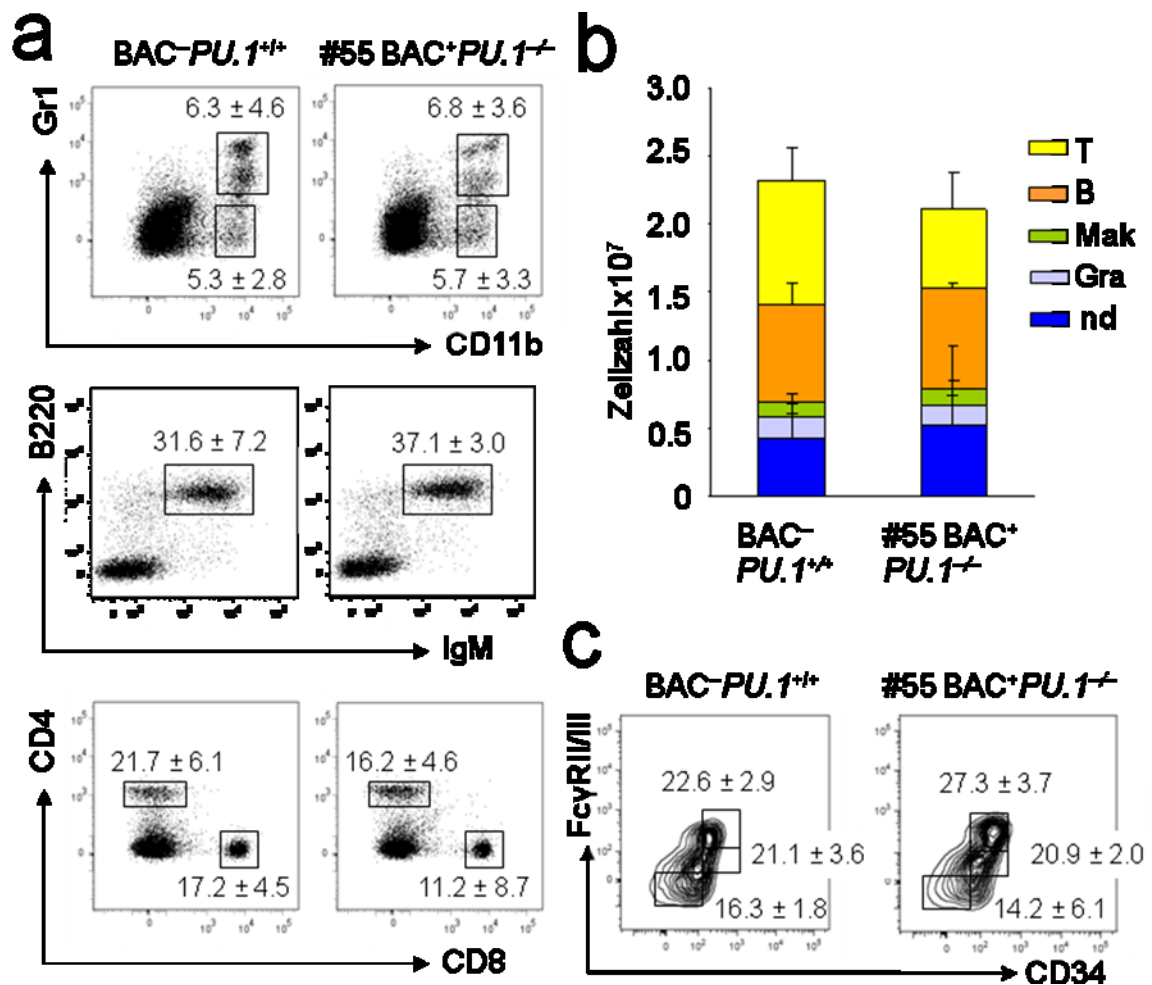


Abbildung 13: Wiederherstellung der Hämatopoiese durch das humane PU.1 BAC

- (a) FACS- Analyse von Splenozyten der angegebenen Genotypen. Zahlen geben durchschnittliche Prozente und deren Standardabweichung der markierten Zellpopulationen für n=6 an. (b) absolute Zellzahlen von T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und Granulozyten in der Milz von den Mäusen analysiert in Abb. 5a. nd = nicht definiert (c) FACS Analyse von GMPs, CMPs und MEPs aus dem Knochenmark. Zahlen geben durchschnittliche Prozente und deren Standardabweichung der markierten Zellpopulationen für n = 3 an.

3.1.4 Funktionale Analysen in transgenen humanen PU.1 BAC-Mäusen

Die in den vorangegangenen Kapiteln vorgenommene phänotypische Beschreibung der transgenen Mäuse lässt die vollständige Funktionalität des humanen PU.1 Protein im murinen System vermuten. Um genaue Aussagen über das Differenzierungspotential von Stamm- und Vorläuferzellen zu treffen, wurden Knochenmarkszellen mit verschiedenen myeloischen Zytokinen stimuliert. Dafür wurden je 50.000 Knochen-

3. Ergebnisse

markszellen in Methylzellulose ausgesät und nach 7 Tagen die Anzahl der Kolonien gezählt und deren Morphologie durch Giemsa- und May-Grünwald-Färbung analysiert (Abbildung 14). Knochenmarkszellen aus transgenen Tieren bildeten unabhängig vom Zytokin eine ähnliche Anzahl an Kolonien wie aus Kontrolltieren. Die Kolonien waren in ihrer Form, Komposition und Morphologie nicht unterscheidbar. Die $URE^{-/-}$ Mäuse, welche hier als PU.1 niedrig exprimierende Kontrolle dienen, zeigten signifikant weniger Kolonien.

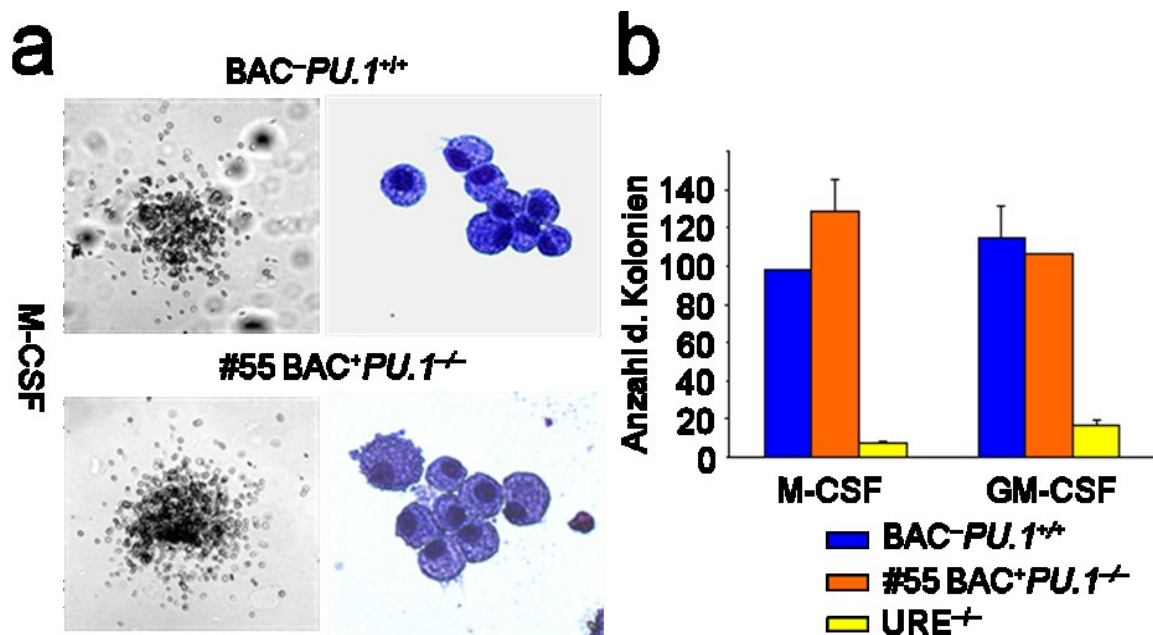


Abbildung 14: Myeloisches Differenzierungspotential von Knochenmarkszellen aus BAC+PU.1^{-/-} Mäusen.

5×10^4 Knochenmarkszellen der angegebenen Genotypen wurden in Methylzellulose mit M-CSF oder GM-CSF ausplattiert. (a) Links: Form von M-CSF stimulierten Kolonien gezeigt als Phasenkontrast. Rechts: Zelluläre Morphologie ist gezeigt durch May-Grünwald-Färbung. (b) Das Balkendiagramm zeigt die Anzahl gezählter Kolonien nach 7d

Das humane PU.1 Protein aktiviert die gleichen Zielgene wie das murine PU.1. *Csf2*, *Ebf1*, *IL7r* und *Csf1r* zeigten in Knochenmarkszellen keine Unterschiede in der Expression zwischen transgenen Tieren und Wildtypen. (Abbildung 15) Die $URE^{-/-}$ Tiere zeigten eine signifikant niedrigere Expression von PU.1 Zielgenen.

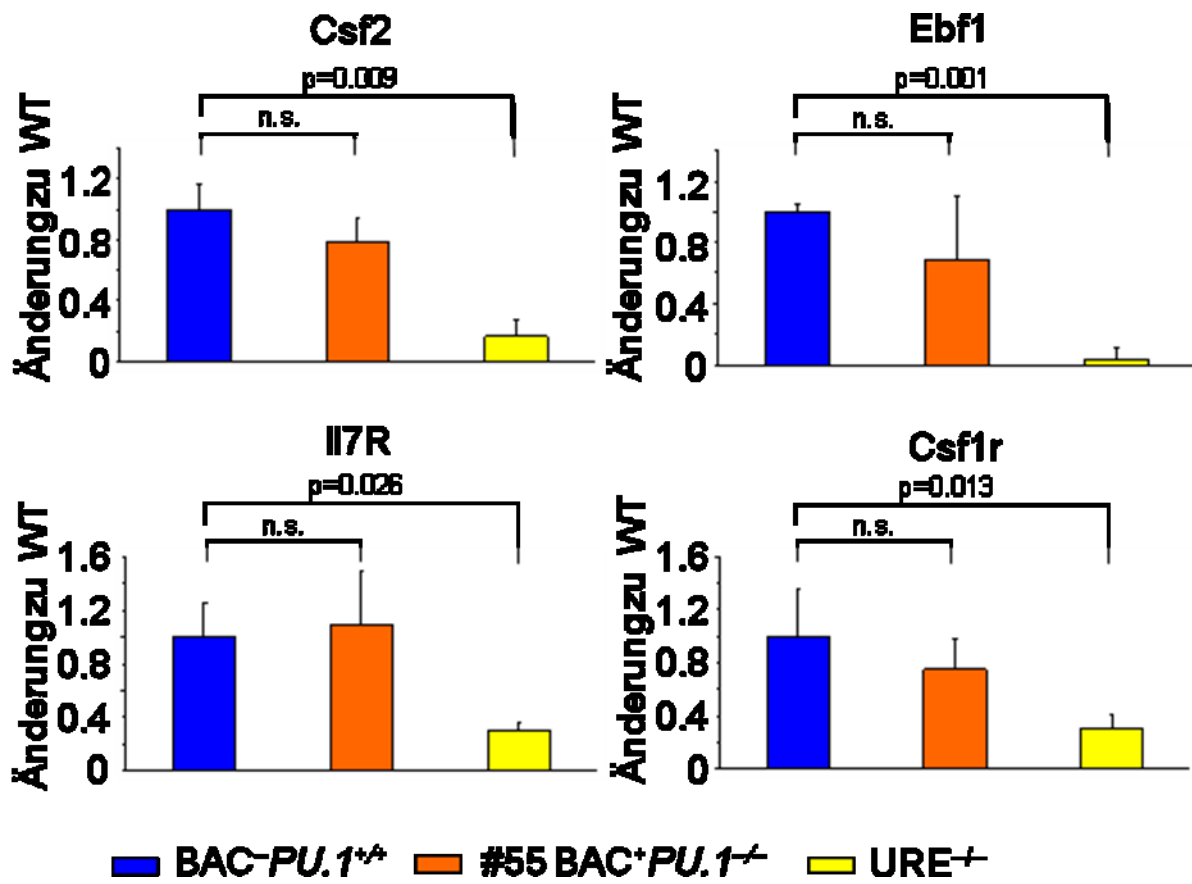


Abbildung 15: Expression von PU.1 Zielgenen.

qPCR zeigt die Expression von PU.1 Zielgenen in Knochenmarkszellen. URE^{-/-} Zellen wurden als Vergleich benutzt. n.s.–nicht signifikant

Die vorangegangenen Analysen der transgenen Mäuse zeigen, dass alle notwendigen regulatorischen Elemente für eine physiologisch korrekte PU.1 Expression auf dem BAC lokalisiert sind. Das humane PU.1-Protein ist in der Lage, das murine PU.1-Protein zu ersetzen und alle anormalen Aspekte des murinen PU.1 defizienten Phänotyps zu revidieren.

3.2 Genomweite Analysen der Chromatinstruktur identifizieren neue aktive *cis*-regulatorische Elemente des PU.1 Lokus

3.2.1 Identifizierung eines neuen potentiellen *cis*-regulatorischen Elementes mittels genomweiter Analysen.

Alle bisherigen Experimente lassen vermuten, dass zusätzlich zur URE noch weitere regulatorische Elemente benötigt werden, um eine physiologisch korrekte PU.1 Expression zu ermöglichen. Aktive von Transkriptionsfaktoren gebundene regulatorische Elemente existieren als DNaseI hypersensitive Seiten (DHSs) (Koch, et al., 2007). Ein Merkmal, das genutzt werden kann, um aktive *cis*-regulatorische Elemente zu identifizieren. Um den PU.1 Lokus komplett abzudecken und regulatorische Prinzipien auf globaler Ebene zu verifizieren, wurden DHSs genomweit in primären Makrophagen als PU.1 stark exprimierenden Zelltyp und B-Zellen als PU.1 niedriger exprimierenden Zelltyp untersucht. In Makrophagen konnten die bereits publizierten DHSs am proximalen Promotor, im Intron 1 und 14kb vor der Transkriptionsstartseite nachgewiesen werden (Abbildung 16) (Li.). Die Daten zeigten aber zusätzliche, bisher unbekannte DHSs am PU.1 Lokus. Eine starke DHS befand sich bei -12kb und 3 schwächere bei -10kb, -9kb und -8kb (benannt nach ihrer Position zu der PU.1 Transkriptionsstartseite.) In B-Zellen zeigte sich ein anderes DHS Muster. Hier gab es die DHS im Promotor und bei -14kb, aber nicht bei den anderen 4 DHS der Makrophagen. Unterschiede in der Stärke der PU.1 Expression zwischen Makrophagen und B-Zellen sind also mit unterschiedlichen DHSs assoziiert. Alle Loci der DHSs stimmten mit Sequenzhomologien zwischen verschiedenen Säugetierspezies überein.

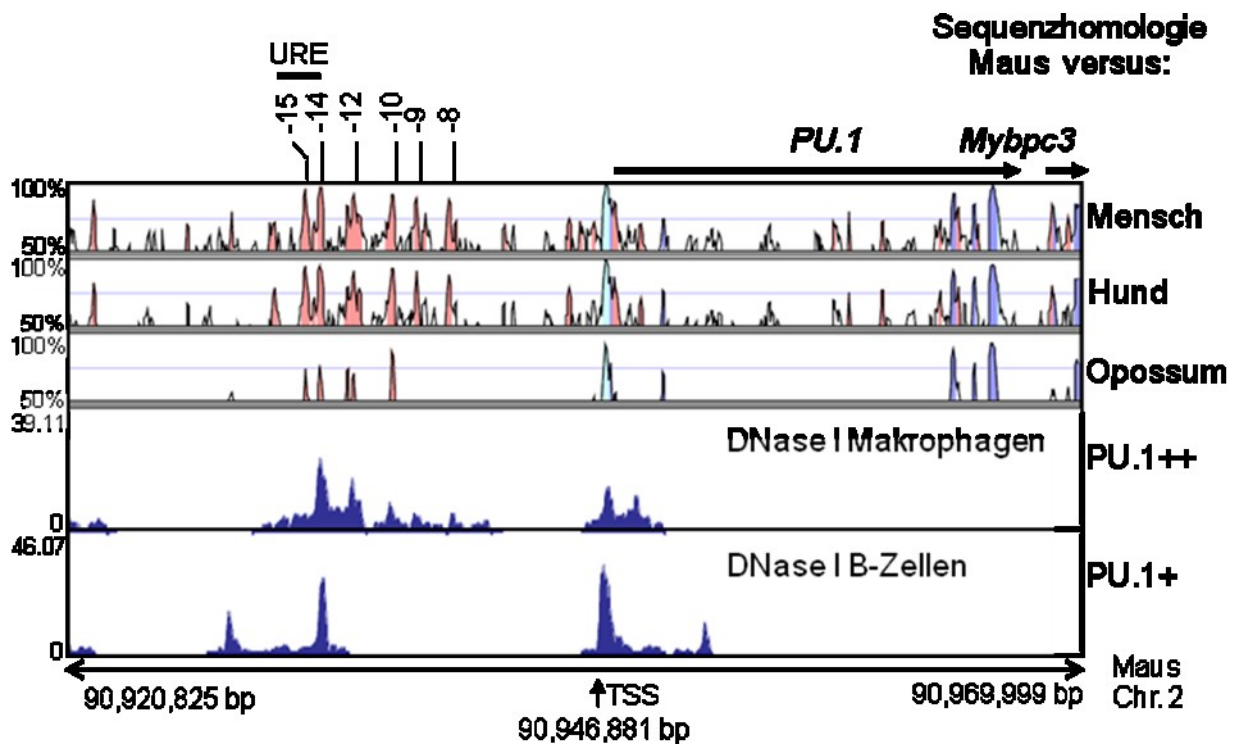


Abbildung 16: Identifikation neuer potentieller *cis*-regulatorischer Elemente von PU.1.

Oberer Abschnitt zeigt MVista Alignment der Sequenzkonservierung über ~50kb der Region des murinen Chromosoms 2, die den PU.1 Locus enthält. Die Abbildung zeigt von oben nach unten Maus/Mensch, Maus/Hund und Maus/Opossum. Die Konservierungsplots zeigen Regionen mit mind. 50% Konservierung (angezeigt auf der y-Achse). Exons in Blau, nicht kodierende Regionen in Pink. Positionen nicht kodierender Regionen sind angezeigt. Genaue Positionsangaben der vorher unbekannten Homologien sind: -12kb = 12,3kb; -10kb = 10,5kb; -9kb = 9,5kb und -8kb = 7,8kb vor der PU.1 TSS. Unterer Abschnitt zeigt ein Bild aus dem UCSC Genome Browser der DHS Sequenzierungsprofile an dem PU.1 Locus *in vitro* in Knochenmarkmakrophagen und B-Zellen aus der Milz. Relative Anreicherung der Sequenzabschnitte ist auf der y-Achse angezeigt. PU.1++ und PU.1+ auf der rechten Seite kennzeichnen ein hohes oder intermediäres PU.1 Expressionslevel.

Aktive regulatorische Elemente sind neben DNase I Aktivität auch durch distinkte Histonmodifikationen gekennzeichnet. Um die neu entdeckten Elemente weiter zu charakterisieren, wurde eine Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) mit Antikörpern gegen Histone 3 Lysine 9 Acetylierung (H3K9Ac), eine Histonmodifikation die mit aktivem Chromatin assoziiert wird (Gross, et al., 1988), durchgeführt. Die myeloischen Zelllinien HPC7 und 416B wurden als PU.1 exprimierende, die embryonale Stammzelllinie HM1 sowie die T-Zelllinie BW5147 als nicht PU.1 exprimierende Zelllinien verwendet. Die mit dem H3K9Ac-Antikörper präzipitierte DNA wurde auf genomischen Tiling Arrays hybridisiert (Abbildung 17a). In beiden myeloischen Zelllinien war eine starke Anreicherung von H3K9Ac um die PU.1 TSS und die URE (-15kb,-14kb) als auch um die -12kb DHS sichtbar. HM1 und BW5147 zeigten keine oder nur

sehr schwache Anreicherung um diese Loci. Dieselben Regionen, die eine Anreicherung von H3K9 Acetylierung in myeloischen Zelllinien aufwiesen, zeigten auch eine Anreicherung von dimethyliertem H3K9 (Abbildung 17b), ebenfalls eine Chromatinmodifikation, die mit aktiven *cis*-regulatorischen Elementen assoziiert wird.

In einer publizierten ChIP-Sequenzierungs-Datenbank aus murinen Makrophagen (Ghisletti, et al., 2010) konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die DHSs -14kb, -12kb und -10kb von der Acetyl-Transferase p300 gebunden werden (Abbildung 17c). Diese markiert ebenfalls aktive regulatorische Elemente der DNA. (Heintzmann, et al., 2007; Visel, et al., 2009).

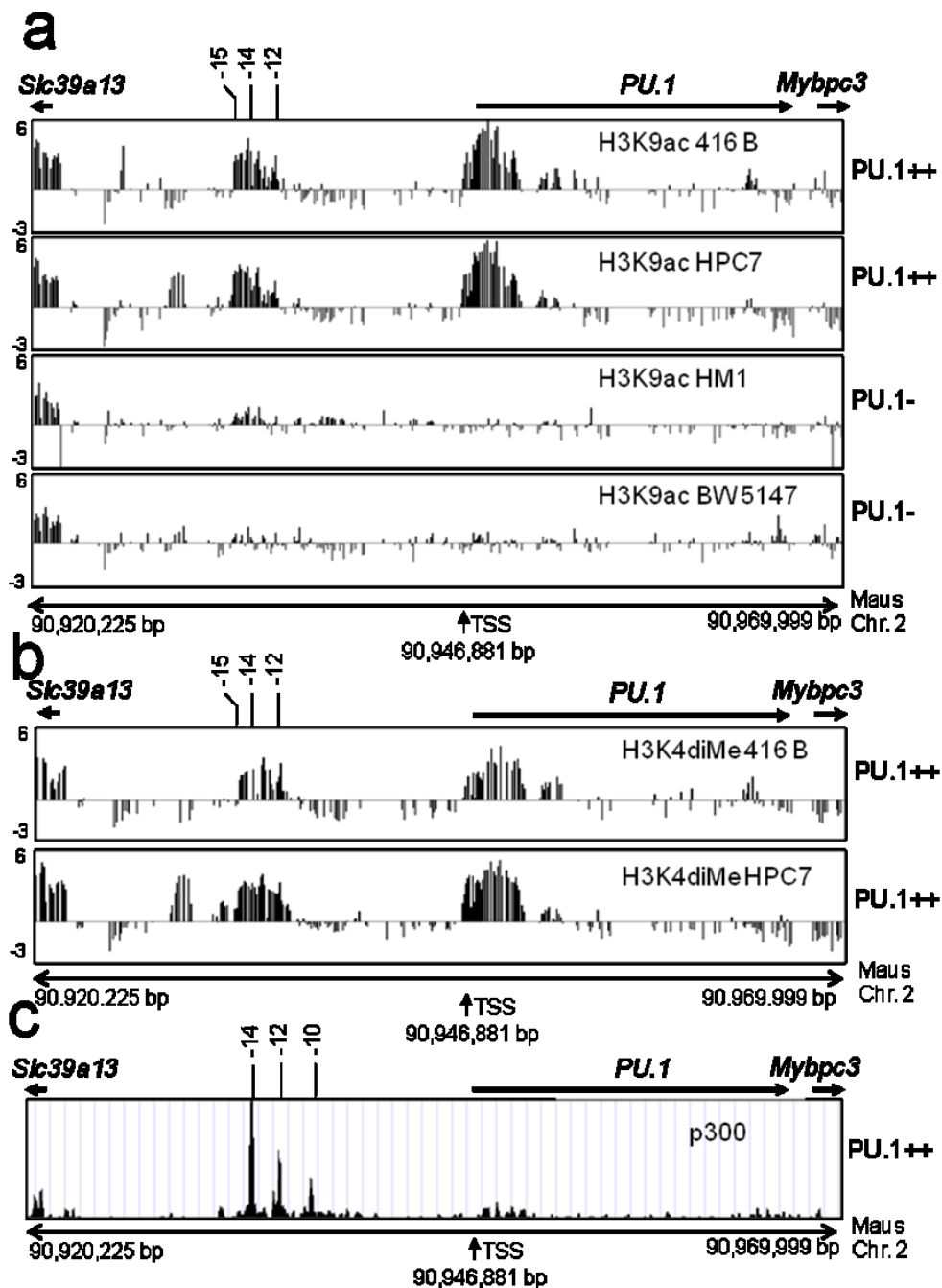


Abbildung 17: Molekulare Charakterisierung der cis-regulatorischen Einheit von PU.1

(a) ChIP-chip Kartierung der H3K9 Acetylierung an dem murinen PU.1 Lokus mittels eigener Tilling Arrays. Die y-Achse gibt die log2 Anreicherung der präzipitierten DNA über der Ausgangsmenge der DNA an. Die X-Achse zeigt ~ 50kb der genomischen Sequenz an, die den PU.1 Lokus trägt. Ganz oben sind die Positionen der identifizierten DHS und die Lage der enthaltenen Gene angegeben. Die genomischen Koordinaten (in bp) des Chromosoms 2 auf dem Array sind unten angezeigt. (b) ChIP-chip – Kartierung der H3K9 Dimethylierung an dem murinen PU.1 Lokus mittels Tilling Array aus 6a. (c) P300 ChIP- Sequenzierung an dem murinen PU.1 Lokus in *in vitro* Knochenmarkmakrophagen zeigen P300 Bindung exklusiv an den angezeigten DHS.

Die oben gezeigten Chromatinstruktur-Analysen erlauben daher, zusätzliche Kandidaten distaler regulatorischer Elemente mit hohem PU.1 Expressionslevel in myeloischen Zellen zu assoziieren.

3.2.2 Funktionale Synergie zwischen distalen regulatorischen Elementen von PU.1 im Chromatin Kontext.

Cis-regulatorische Elemente sind in der Lage, die Expression des zugehörigen Gens zu modifizieren. In Reporter-gen-Experimenten wurde die Fähigkeit der neu identifizierten DHSs getestet, PU.1-Promotor vermittelte Luciferaseaktivität anzuregen. Es wurde eine Serie von DNA-Konstrukten hergestellt, in denen ein Luciferasegen von dem minimalen 0,5kb PU.1-Promotor zusammen mit der -15kb/-14kb (URE) DHS, der -12kb DHS, der -10kb DHS alleine oder in Kombination gesteuert wird. Diese Konstrukte wurden in die RAW 264.7 Makrophagen-Zelllinie und in Namalwa B Zelllinie eingebracht. Die Anzahl der stabil integrierten Plasmide wurde in Einzelklonen oder den Zellpools durch Southern Blot und qPCR bestimmt (Daten nicht gezeigt). In myeloischen Zellen war der Promotor nicht in der Lage, Reporter-genaktivität zu induzieren, während die URE einen stark anregenden Effekt auf die Reporter-genaktivität hatte (Abbildung 18). In schwächerem Ausmaß hatte die -12kb DHS verstärkenden Effekt auf die Luciferasegen-Expression. Die Kombination aus URE und -12kb DHS hingegen hatte einen 10x stärkeren Effekt auf die Luciferasexpression als nur die URE alleine. Im Gegensatz dazu zeigte die -10kb DHS alleine oder in Kombination mit den anderen DHS keinen verstärkenden Effekt auf die Luciferaseaktivität. In B-Zellen war die Situation anders. Hier hatte die Addition der -12kb DHS zur URE keinen zusätzlichen Effekt.

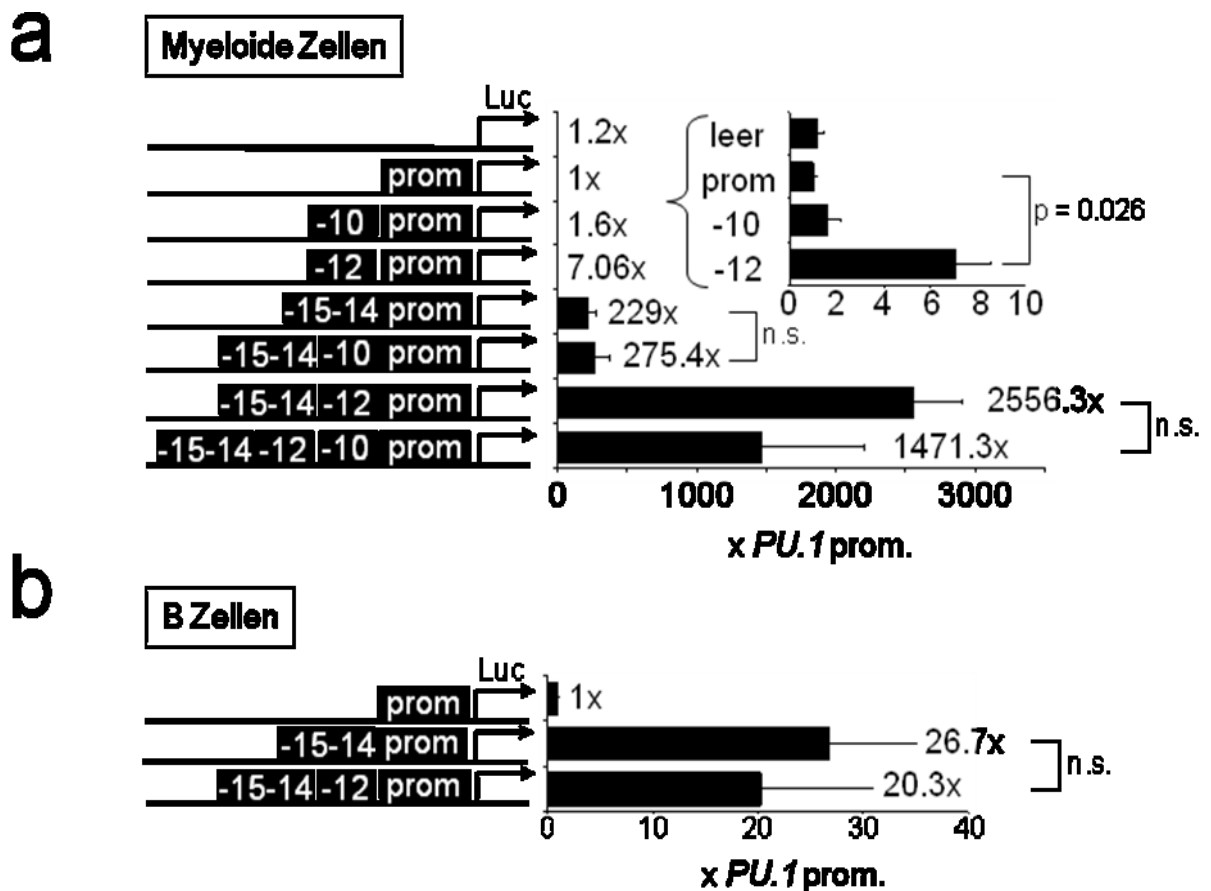


Abbildung 18: PU.1 Promotor-vermittelte Enhancer-Aktivität potentieller cis-regulatorischer Elemente

(a) Luciferase Assay in stabil transfizierten RAW 264.7 Makrophagen mit links angezeigten Konstrukten. Verschiedene unabhängige Klone wurden für jedes Konstrukt untersucht und die Luciferaseaktivität zu der durch Southern Blot bestimmten Kopienzahl normalisiert. Gezeigt ist der Durchschnitt für n=6 unabhängige Klone für jedes Konstrukt. Die durchschnittliche Aktivität des Promotors wurde = 1 gesetzt. Der Einsatz zeigt eine Vergrößerung der Werte der angezeigten Konstrukte. n.s. = nicht signifikant. (b) Luciferase Assay von Namalwa B-Zelllinie, die mit den angezeigten Konstrukten stabil transfiziert wurde. Gezeigt sind die Durchschnittswerte von 3 unabhängigen Klonen pro Konstrukt.

Die Ergebnisse dieses Abschnittes identifizieren die -12kb DHS als ein *cis*-regulatorisches Element von PU.1. Die -12kb DHS kann kooperativ mit der URE im Chromatin zusammen arbeiten, um in myeloischen Zellen hohe PU.1 Expressionslevel zu generieren. In B-Zellen scheint eine Aktivierung der -12kb DHS alleine oder in Kooperation mit der URE nicht möglich.

3.3 Myeloisch-spezifische PU.1 Selbstaktivierung ist notwendig für -12kb DHS Funktion

3.3.1 PU.1 Bindung an die -12kb DHS

Wie Abbildung 19 zeigt, enthält die -12kb DHS eine hochkonservierte PU.1 Bindestelle (Friedman, 2002).

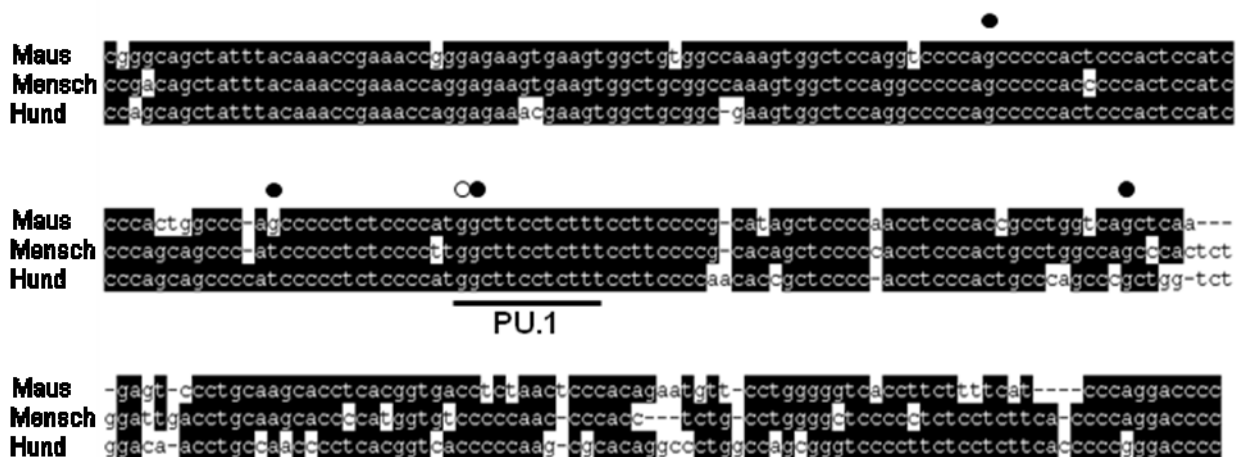


Abbildung 19: Sequenzvergleich der -12kb DHS von Maus, Mensch und Hund.

Identische Basenpaare sind schwarz markiert. Die PU.1 Bindestelle wurde identifiziert mit rVISTA Software und ein in Makrophagen beobachtetes DMS-footprint-Muster ist mit schwarzen Punkten über der Sequenz gekennzeichnet.

Die spezifische Bindung des PU.1-Proteins an die -12kb DHS konnte in einem EMSA nachgewiesen werden, dessen Sonde die vermutete Bindestelle enthält (Abbildung 20). Eine Bande konnte im Proteinextrakt PU.1-exprimierender RAW 264.7 Zellen, nicht aber in nicht PU.1-exprimierenden NIH-3T3 Fibroblasten nachgewiesen werden. Die Identifizierung dieser Bande als PU.1 Bindung erfolgte zum einen durch eine Verdrängung mit nicht markierter Sonde (comp) zum andern durch einen PU.1 Antikörper, der zu einer Verlagerung der Bande (ss) führte.

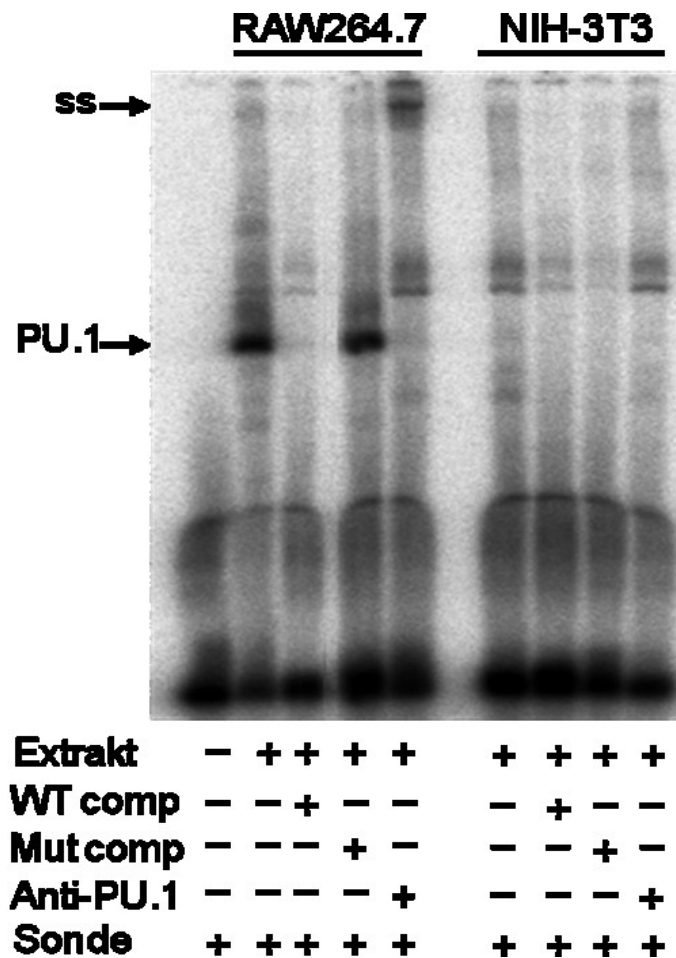


Abbildung 20: *in vitro* PU.1 Bindung an die -12kb DHS.

Zellkernextrakte von RAW 264.7 (links) und NIH-3T3(rechts) wurden mit einer P³²-markierten Sonde inkubiert (die die potentielle PU.1 Bindestelle der -12kb DHS enthält) und zusätzlich mit einem Antikörper gegen PU.1 oder einer nicht markierten Sonde zur Verdrängung der markierten Sonde. Basenpaaraustausch von gaggaagc zu gagcgcg im PU.1 Motiv sind angezeigt (mut). Rechts: Der schwarze Pfeil markiert die Position des Super Shifts (ss) der Bande durch den Antikörper gegen PU.1.

In vivo konnte ebenfalls eine Bindung des PU.1 Proteins an die -12kb DHS in Makrophagen gezeigt werden. Der Vergleich der DNS-Daten aus Abbildung 16 mit bereits publizierten genomweiten PU.1-Bindungsdaten aus einer ChIP-Sequenzierung (Heinz, et al., 2010) ergab in Makrophagen für beide Datensätze eine sehr ähnliche Verteilung der Signale (Abbildung 21). An allen vorher identifizierten DHSs konnte ebenfalls PU.1 Bindung nachgewiesen werden. In B-Zellen zeigte sich eine restriktivere Verteilung der PU.1 Bindung. Nicht alle DHSs zeigten auch PU.1 Bindung. Die Bindung war nur an der -14kb DHS und am Promotor nachweisbar.

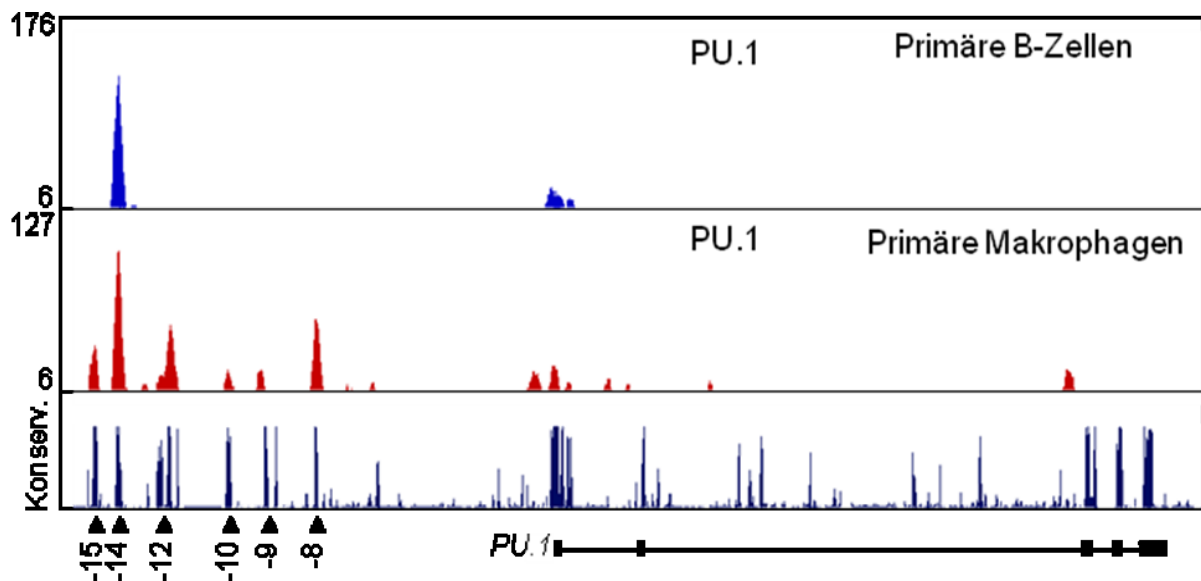


Abbildung 21: *in vivo* PU.1 Bindung an die -12kb DHS.

USCS Genome Browser Ausschnitt repräsentiert die PU.1 Bindung am PU.1 Lokus in murinen peritonealen Makrophagen (Mitte) und CD19+ B-Zellen (oben) als ChIP-Sequenzierung in log2.

3.3.2 Autoregulation der PU.1-Expression durch die -12kb DHS

Die vorangegangenen Analysen werfen die Frage auf, ob die PU.1 Bindung notwendig ist für die Funktion der -12kb DHS. Um zu kontrollieren, ob die PU.1 Bindung an der -12kb DHS deren Funktion beeinflussen kann, wurde durch shRNA die PU.1 Expression in RAW 264.7 Zelllinien stark verringert und anschließend die Reportergenaktivität und H3K9 Acetylierung bestimmt. Nach der Verringerung der PU.1 Expression war in den mit dem -12kb DHS/Luciferase-Konstrukt stabil transfizierten RAW264.7 Zellen keine Reportergenaktivierung mehr möglich (Abbildung 22a). Die PU.1 Verminderung zeigte in RAW 264.7 Zellen eine starke Reduzierung der H3K9 Acetylierung an der -12kb DHS (Abbildung 22b).

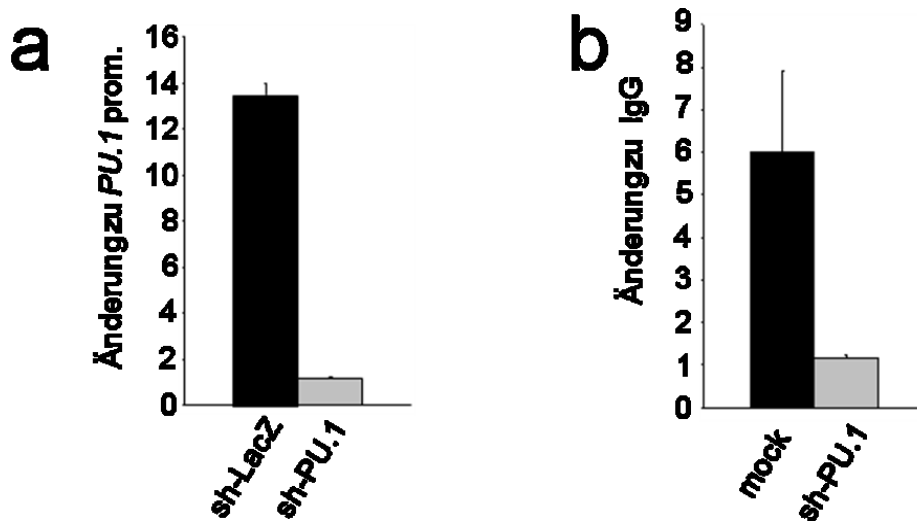


Abbildung 22: Regulation der -12kb DHS Funktion durch PU.1 Bindung

(a) Reportergenexperiment mit RAW 264.7 Zellen, stabil transfiziert mit -12kb DHS/Luciferase-Konstrukt. Zellen wurden mit shRNA-Konstrukt gegen die PU.1- oder LacZ-mRNA (Kontrolle), zusammen mit einem GFP Marker transfiziert und anschließend anhand des GFP-Markers sortiert. Die Werte sind normalisiert gegen die Luciferaseaktivität, die durch den PU.1 Promotor alleine gesteuert wird. (b) ChIP-qPCR von RAW 264.7 Zellen unbehandelt (mock) oder stabil transfiziert mit shRNA gegen PU.1-mRNA zeigen reduzierte H3K9Acetylierung an der -12kb DHS nach der Verringerung der PU.1-Proteinexpression.

Diese Daten zeigen, dass die hohen PU.1 Expressionslevel in myeloischen Zellen von einer zelltypspezifischen PU.1 abhängigen Schleife reguliert werden, die alle *cis*-regulatorischen Elemente mit einbezieht.

3.4 PU.1 Bindung an die -12kb DHS erfordert die Bindung von C/EBP α an die URE

Warum erfolgt die PU.1 Bindung an die URE in beiden Zelltypen, während die Bindung an die -12kb DHS ausschließlich in myeloischen Zellen möglich ist? Zur Klärung wurden die genomweiten DHS-Daten auf allgemeine mit offenem Chromatin assoziierte Transkriptionsfaktorbindestellen untersucht. Es existieren 58.628 DHS in Makrophagen und 72.959 DHS in B Zellen. 43,5 % der Makrophagen- und 54,6 % der DHS in B-Zellen sind zelltypspezifisch. Von diesen waren 35,9% in Makrophagen und nur 14,5% in B-Zellen und 11,5% in beiden Zelltypen von PU.1 gebunden (Abbildung 23 a, b). Eine offene Chromatinstruktur in Makrophagen ist also teilweise von PU.1 Bindung abhängig. Eine weitere Aufteilung der PU.1 gebunden DHS anhand

ihrer genomischen Koordinaten in Relation zu der PU.1 TSS zeigte, dass die zelltyp-spezifischen Unterschiede in der PU.1 Bindung hauptsächlich in Promotor-distalen Elementen stattfinden (Abbildung 23c).

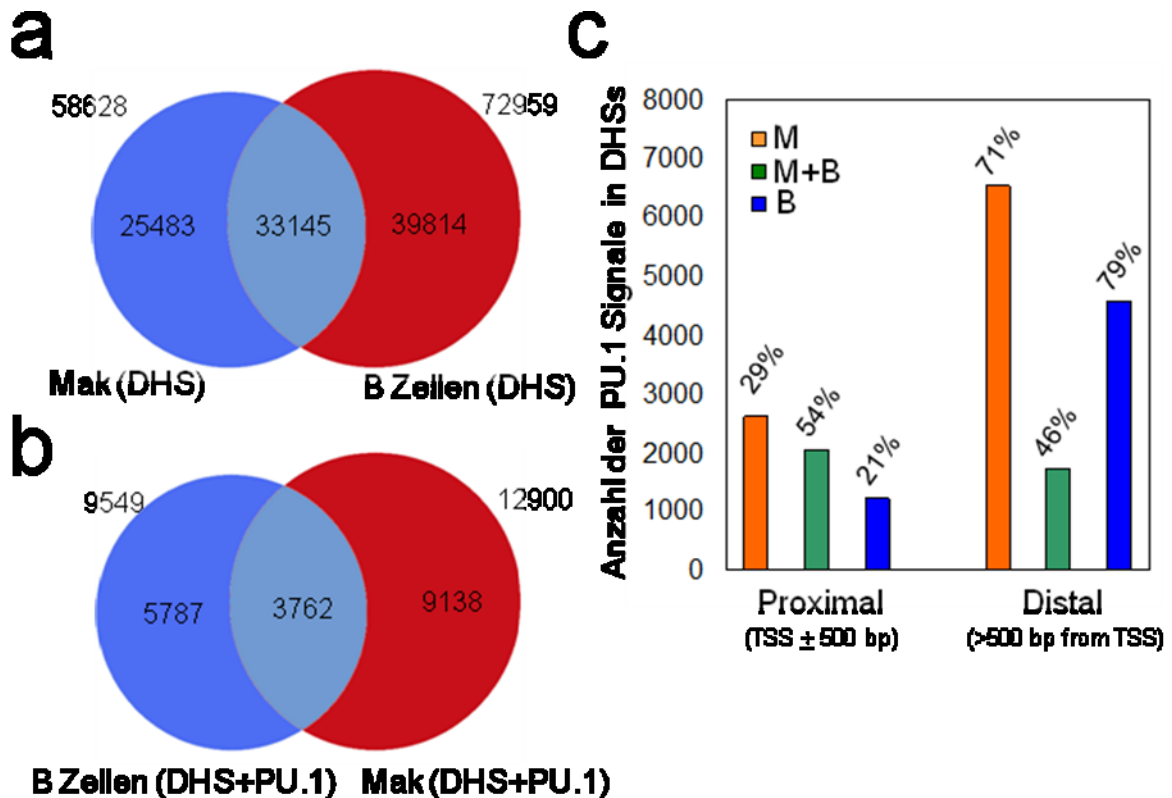


Abbildung 23: Anzahl und Verteilung von PU.1 DHS in verschiedenen Zelltypen des hämatopoietischen Systems

(a) Venn Diagramm zeigt komplette Anzahl an DHSs in Makrophagen und B-Zellen. (b) Anzahl PU.1 gebundener DHSs in Makrophagen und B-Zellen. (c) Anzahl von PU.1 gebundenen DHSs spezifisch für Makrophagen (M), B-Zellen (B) und gemeinsam für beide Zelltypen (M+B), aufgeteilt nach ihrer Position distal (über 500 bp entfernt) oder proximal (innerhalb 500 bp) der PU.1 TSS.

Um herauszufinden welche Transkriptionsfaktoren am meisten mit einer PU.1 Bindung assoziiert sind, wurde eine *de novo* Analyse wie beschrieben (Heinz, et al., 2010) durchgeführt. In nicht-zelltypspezifisch PU.1-gebundenen DHS gab es keine Präferenz für B-Zell- oder Makrophagen-Faktoren. In den B-Zellen war die PU.1-Bindung vermehrt mit B-Zell-Faktoren wie EBF und E2A assoziiert, während in Makrophagen am meisten AP-1 und C/EBPs gemeinsam mit PU.1 lokalisiert waren. Aus der Familie der C/EBPs ist C/EBP α in myeloischen Zellen am stärksten exprimiert. Es wird nicht in B-Zellen exprimiert und kann die PU.1 Expression erhöhen. Außer-

dem ist mit C/EBP α nach dessen ekotropher Aktivierung die Transdifferenzierung von B-Zellen in Makrophagen möglich (Bussmann, et al., 2009). Um zu prüfen, ob C/EBP α Expression in der Lage ist, den Chromatinstatus an der -12kb DHS zu modifizieren, wurde eine reprogrammierbare B-Ziellinie in Makrophagen transdifferenziert. Diese Zelllinie trägt ein stabil integriertes Östrogenrezeptor-gekoppeltes C/EBP α -Expressionskonstrukt. Nach der Applikation von β -Estradiol oder Tamoxifen wird C/EBP α in dieser Zelllinie exprimiert und die Transdifferenzierung induziert. Während dieser Kinetik wurde zu verschiedenen Zeitpunkten die H3K9 Acetylierung, die PU.1-Bindung und Expression als auch die Okkupanz der -12kb DHS durch Transkriptionsfaktoren analysiert. Nach 72h Induktion wurde eine Änderung der Belegung der -12kb DHS mit Transkriptionsfaktoren festgestellt (Abbildung 24a), Makrophagen-spezifische Bindestellen waren besetzt. Die Reprogrammierung führte zu einem aktiven Chromatinstatus, gekennzeichnet durch eine Erhöhung der H3K9 Acetylierung an der -12 kb DHS (Abbildung 24b). C/EBP α Expression war in der Lage, die PU.1 Expression zu verstärken und PU.1 Bindung an der -12kb DHS zu induzieren (Abbildung 24 c, d).

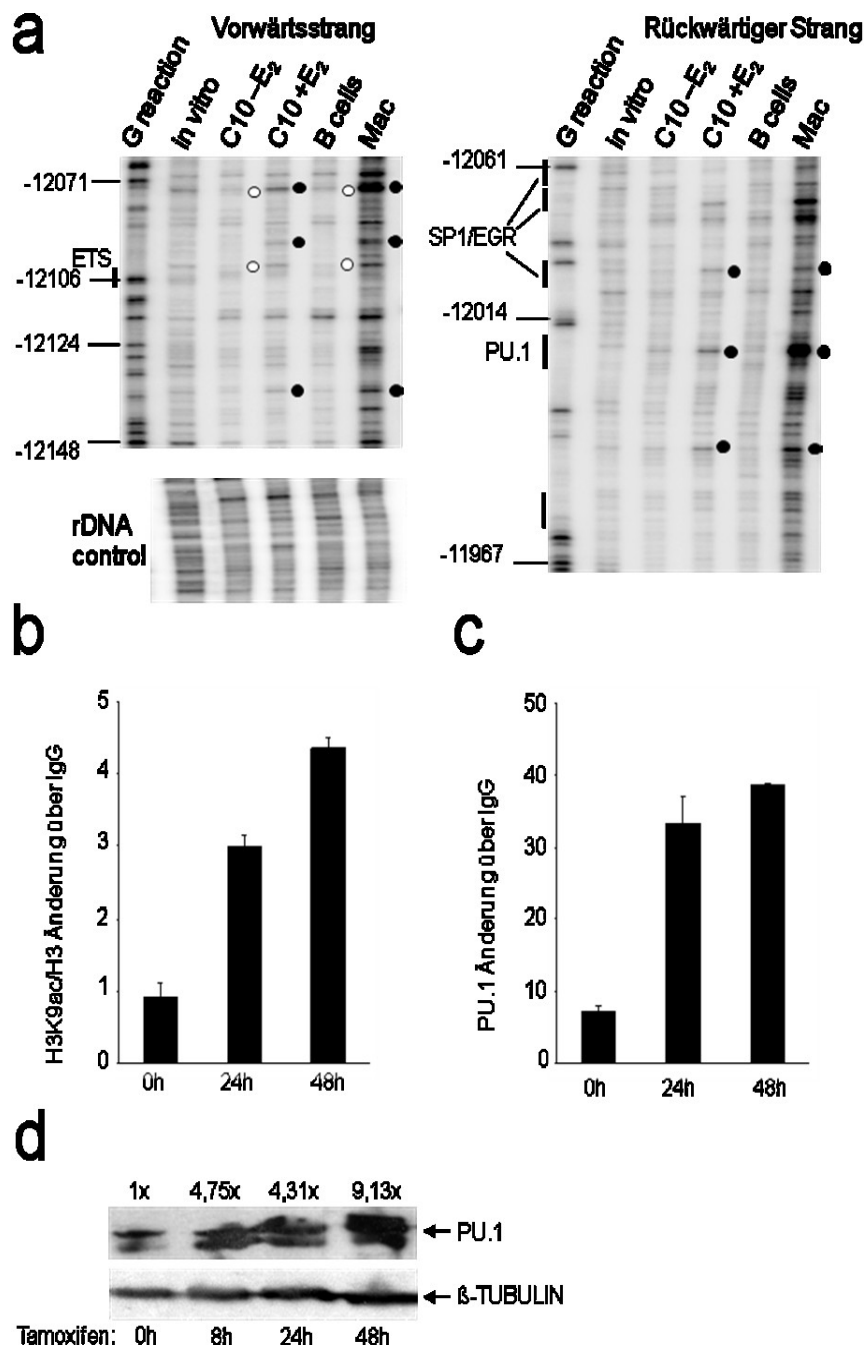


Abbildung 24: Änderung des -12kb DHS Status nach C/EBPα Expression:

(a) DNaseI footprint der -12 kb DHS in C10-Zellen vor (-E₂) und nach (+E₂) 72h β-Estradiol Induktion, in B-Zellen und in Makrophagen. *In vitro* behandelte DNA dient als Kontrolle. Die G-Reaktion zeigt die genomische Lokalisation relativ zur PU.1 TSS. Proben wurden analysiert für den Vorwärtsstrang (linke Abbildung 5'-3') und den Rückwärtsstrang (rechte Abbildung 3'-5') in der -12kb DHS. Primer für rDNA-Gene wurden als Ladekontrolle benutzt. Hyperreaktive Regionen sind mit schwarzem und geschützte Regionen mit weißem Kreis gekennzeichnet. (b) Western Blot zeigt eine Zunahme der PU.1 Expression in C/EBPα-ER exprimierenden C10 Zellen nach einer β-Estradiol-Induktion in dem angegebenen Zeitintervall. Graustufenquantifizierung wurde mittels ImageJ berechnet. (c, d) ChIP-qPCR zeigt die Zunahme in der H3K9Acetylierung (c) und PU.1 Bindung (d) an der -12kb DHS in β-Estradiol behandelten C10 Zellen.

In ChIP-Sequenzierungen konnte keine direkte Bindung von C/EBP α an die -12kb DHS nachgewiesen werden (Abbildung 25). An der -14kb DHS, -9kb DHS, -8kb DHS und im Intron 1 war dagegen eine Bindung nachweisbar.

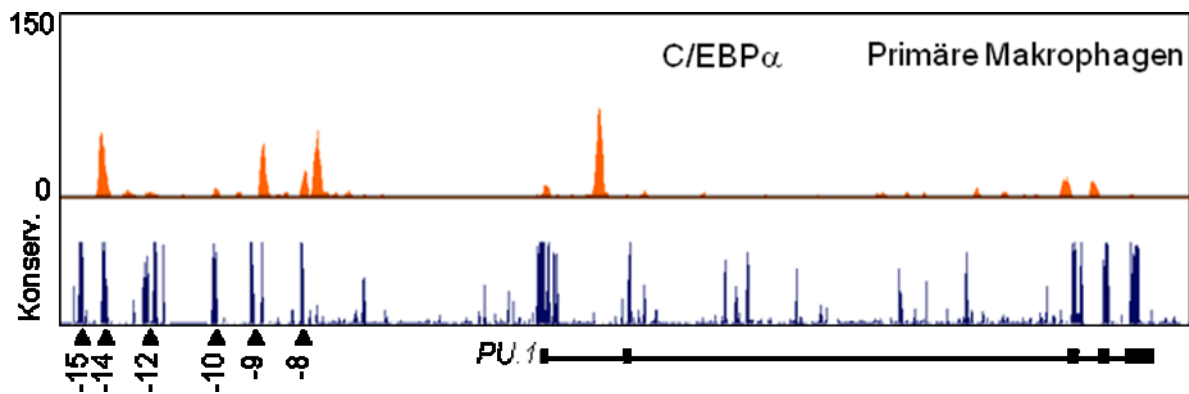


Abbildung 25: C/EBP α -Bindung am PU.1 Lokus.

Oberes Bild: UCSC Genome Browsers Bild zeigt C/EBP α ChIP-Sequenzierung in primären Makrophagen. Unteres Bild: UCSC Genome Browser zeigt Konservierung des PU.1 Lokus zwischen Maus und Mensch.

Ein Vergleich der ChIP- und DHS Daten zeigte, dass C/EBP α nur 38,9% (3186) aller Promotor-distalen DHS zusammen mit PU.1 in Makrophagen bindet (Daten nicht gezeigt). Das zeigt, dass viele aber nicht alle PU.1 gebundenen DHS gleichzeitig auch von C/EBP α gebunden werden. C/EBP α kann nur indirekt über eine Bindung an andere *cis*-regulatorische Elemente -wie z.B. die URE- die Aktivität der -12kb DHS beeinflussen. Tatsächlich führten Mutationen in den drei C/EBP α Bindestellen der URE und/oder der PU.1 Bindestelle in der -12kb DHS zu stark reduzierter Reportergenaktivität (Abbildung 26 a). Auch die Acetylierung der exogenen -12kb DHS nach den Mutationen war herabgesetzt.(Abbildung 26 b, c) In Zellen, abgeleitet von einer URE^{-/-} Maus, war retroviral-transduziertes Östrogenrezeptor-gekoppeltes C/EBP α nach Induktion mit Tamoxifen zudem nicht in der Lage, PU.1 Bindung und einen Anstieg der H3K9 Acetylierung an der -12kb DHS zu induzieren (Abbildung 18b).

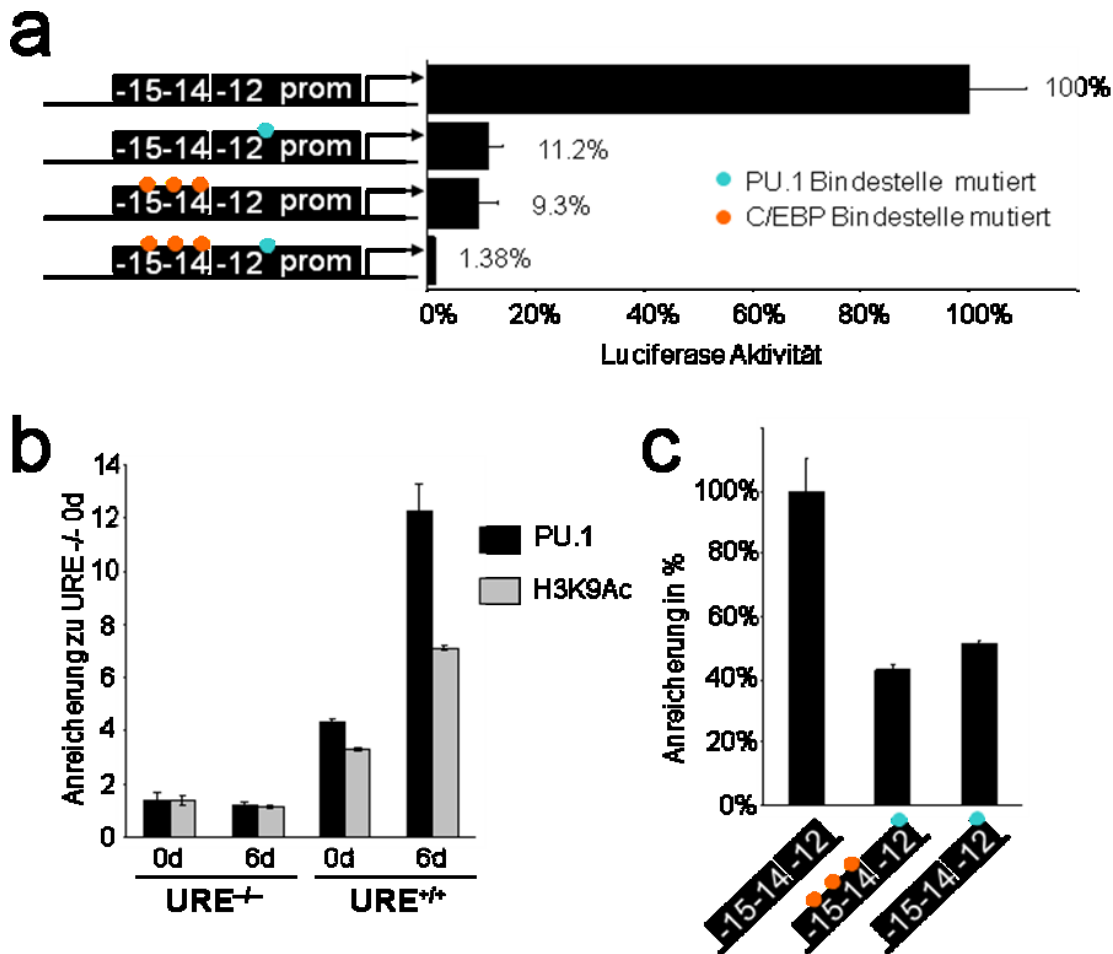


Abbildung 26: Mutationen der Transkriptionsfaktorbindestellen in den *cis*-regulatorischen Einheiten von PU.1 führt zu Verlust der Enhanceraktivität.

(a) Reportergen-Assay in mit angezeigten Konstrukten stabil transfizierten RAW 264.7 Zellen. Mutationen in PU.1 Bindestelle (blau) und C/EBP α Bindestellen (orange) sind angezeigt. Gezeigt sind Durchschnittswerte von 3 unabhängigen Zell-Pools. Aktivität des Wildtypkonstrukts wurde auf 100% gesetzt. (b) ChIP-qPCR an der -12kb DHS in myeloischen URE^{+/+} und URE^{-/-} Zellen nach retroviraler Transfektion mit Tamoxifen-induzierbarem C/EBP α Expressionskonstrukt. Gezeigt ist die PU.1 Bindung (schwarz) und die H3K9 Acetylierung (grau) vor und nach 6d Induktion mit β -Estradiol.

Zusammengenommen zeigen die durchgeführten Experimente, dass (i) die URE Chromatin Aktivierung an der -12kb DHS in myeloischen , nicht aber in B-Zellen reguliert, (ii) PU.1 nur in myeloischen Zellen die -12kb DHS binden kann und (iii) in myeloischen Zellen die Bindung von C/EBP α an die URE die -12kb DHS für den autotregulatorischen Eintritt von PU.1 ins Chromatin vorbereitet. Des weiteren legen die genomweiten Daten der offenen Chromatin Regionen und die PU.1- und C/EBP α Bindungsdaten in Makrophagen und B-Zellen nahe, dass ähnliche Regulationsmechanismen ebenfalls auf globalen Level statt finden.

4 Diskussion

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der wesentlichen Frage: Durch welche Mechanismen wird der hämatopoietische Faktor PU.1 transkriptionell reguliert? Im Detail erfolgte die Beantwortung dieser Frage durch die Definition neuer *cis*-regulatorischer Elemente von PU.1 und deren möglicher Funktionsweise. Die Ergebnisse dieser Studie werden im Folgenden diskutiert.

4.1 Definition der *cis*-regulatorischen Einheit von PU.1

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass die URE die Expression von PU.1 in allen PU.1 exprimierenden Zelltypen beeinflusst. In Abwesenheit der URE kommt es zu einem frühen Block in der Differenzierung und bereits frühe myeloische Vorläufer sind nicht mehr unterscheidbar (Rosenbauer, et al., 2006). Die URE agiert als ein generelles *cis*-regulatorisches Element, das in verschiedenen hämatopoietischen Zelltypen eine Funktion ausübt. Es konnte auch nachgewiesen werden, dass die URE zwar notwendig, nicht aber ausreichend ist, um hohe PU.1 Expressionslevel zu generieren (Leddin, et al., 2011). Um die Frage nach weiteren *cis*-regulatorischen Elementen zu beantworten, wurde in der hier gezeigten Studie ein BAC-Mausmodell in PU.1 defizientem Hintergrund generiert, welches den humanen PU.1 Locus enthält. Die Analyse dieser Mäuse zeigt eine komplette Wiederherstellung der Hämatopoiese mittels des humanen PU.1. Diese Daten legen nahe, dass alle regulatorischen Elemente für eine korrekte zeitliche und räumliche PU.1 Expression auf dem BAC enthalten sind. Genomweite DHS- und Homologieanalysen halfen dabei, einen neuen Abschnitt distal gelegener *cis*-regulatorischer Elemente zu identifizieren. Zarnegar et al. konnten in einer unabhängig durchgeführten Studie ebenfalls Einflüsse von Homologien dieser Region

auf die PU.1 Expression nachweisen und in myeloischen Zellen das gleiche DHS Muster bestätigen (Zarnegar, et al., 2010). In den verschiedenen Zelltypen des hämatopoietischen Systems sind die DHS-Muster an den *cis*-regulatorischen Elementen sehr unterschiedlich. Die URE ist das einzige gemeinsame aktive distale Element in B-Zellen und Makrophagen. Dies bestätigt die Annahme, dass die URE in verschiedenen Zelltypen des hämatopoietischen Systems eine generelle Rolle in der Regulation der PU.1 Expression hat. Die Analysen mit dem BAC legen nahe, dass es sich bei der hier beschriebenen Region regulatorischer Elemente um die Gesamtheit der PU.1 regulierenden Sequenzen handelt. Alle anderen Sequenzhomologien auf dem BAC konnten anderen Genen zugeordnet werden oder zeigten keinen spezifischen PU.1-Promotor-vermittelte Anregung eines Reportergens.

Die Studien der transgenen Mäuse lassen weiterhin vermuten, dass murines durch humanes PU.1 substituierbar ist. Beide werden in denselben Zelltypen der Hämatopoiese exprimiert. Damit könnte auch eine Fehlregulation von PU.1 im Menschen ursächlich für AML sein. Steidl, et al., (2007) konnten zeigen, dass ein einzelner Nukleotid-Polymorphismus in der Bindestelle für SATB1 in der URE die PU.1 Expression beeinflusst und mit einem Subtyp der AML korreliert. Eine Mutation in den hier definierten *cis*-regulatorischen Elementen könnte ebenfalls Effekte auf die PU.1 Expression und eine mögliche Leukämieentwicklung haben.

4.2 Hierarchie und Synergie *cis*-regulatorischer Elemente

Die molekulare Analyse der identifizierten DHS ergab einen neuen Enhancer in myeloischen Zellen bei -12kb. In Kombination mit der URE ist diese DHS in der Lage, hohe PU.1 Expressionslevel zu ermöglichen. Die Addition zusätzlicher DHS-Sequenzen erbrachte keine weitere Steigerung der PU.1 Expression im Chromatinkontext. Der Großteil der transkriptionellen

und aktivierenden chromatinmodulierenden Aktivität wird vermutlich durch diese beiden regulatorischen Elemente erbracht. Die hier gezeigten Studien beweisen, dass die URE nur in Verbindung mit andern *cis*-regulatorischen Elementen eine korrekte zellspezifische PU.1 Expression gewährleisten kann. Die Funktion anderer DHS bleibt weiterhin unklar. Ob sie insulatorische oder repressive Funktionen haben muss in zukünftigen Studien gezeigt werden.

Ein Mechanismus um die Expression von Genen während der zellulären Differenzierung zu justieren ist die Autoregulation durch Bindung von Transkriptionsfaktoren an ihre regulatorischen Elemente (Okuno, et al., 2005). So ist z.B. die Bindung von GATA1 an seinem Promotor existentiell für die Entwicklung eosinophiler Zellen (Yu, et. al., 2002). Auch durch PU.1-Bindung an die URE konnte eine positive Regulation der PU.1 Expression nachgewiesen werden (Okuno, et al., 2005). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine PU.1 Bindung an den -12kb Enhancer. Diese Bindung ist notwendig, um einen aktiven Chromatinstatus an der -12kb DHS aufrecht zu erhalten. Damit kann der Enhancer seine Funktion nur in bereits PU.1 exprimierenden Zellen ausüben. Im Gegensatz dazu ist die URE in der Lage, diesen Chromatinstatus auch in Abwesenheit einer PU.1 Expression auszubilden. Außerdem wird die URE durch Transkriptionsfaktoren wie z.B. Runx1 gebunden, die in der frühen Hämatopoiese eine wichtige Rolle spielen (Hoogenkamp, et al., 2008). Diese Unterschiede implizieren eine Hierarchie in der Aktivierung der einzelnen DHS. Vermutlich erfolgt die Öffnung der regulatorischen Elemente von der URE. Während der zellulären Differenzierung des hämatopoietischen Systems können beide DHS eine Rolle zu unterschiedlichen Zeitpunkten spielen.

4.3 Spezifische Interaktion der URE mit -12kb DHS in myeloischen Zellen

In den Reportergendaten konnte der -12kb Enhancer nur in myeloischen Zellen Luciferaseaktivität anregen. Auch die DHS und ChIP-Daten lassen nur in myeloischen Zellen eine Funktion zu. Das höhere PU.1 Expressionslevel in diesem Zelltyp kann also nur über die Interaktion der URE mit dem -12kb Enhancer generiert werden. Warum aber ist eine Interaktion beider regulatorischen Elemente in B-lymphoiden Zellen nicht möglich? Zur genaueren Untersuchung der Unterschiede zwischen B-lymphatischen und myeloischen Zellen wurden die PU.1 ChIP-Daten auf assoziierte Bindemotive in den präzipitierten Sequenzen untersucht. In Makrophagen sind C/EBP-Bindestellen mit am häufigsten unter den PU.1 assoziierten Sequenzen in distalen DHS. Die Hälfte aller PU.1 gebundenen DHS ist gleichzeitig auch mit C/EBP-Faktoren besetzt, die andere Hälfte hat keine C/EBP-Bindestellen. Die Bindung von PU.1 erfordert also nicht generell eine C/EBP-Bindung. C/EBP α wird innerhalb des hämatopoietischen Systems nur in myeloischen Zellen exprimiert und hat die Fähigkeit die Chromatinstruktur zu modifizieren (Xie, et al., 2004). So führt die Expression von C/EBP α in lymphatischen und frühen myeloischen Vorläuferzellen zu einer Chromatinreorganisation und PU.1 Bindung an den -12kb Enhancer. Die Aktivierung des Chromatins an der -12kb DHS erfordert in jedem Fall die URE, da C/EBP α -Bindung nur an der -14kb DHS nachgewiesen werden konnte. Die von der URE ausgehende Öffnung und Aktivierung des -12kb Enhancer in myeloischen Zellen wird also durch C/EBP α vermittelt (Abbildung 27). Ebralidze, et al., (2008) konnten zeigen, dass von der URE nicht-kodierende RNAs exprimiert werden. Diese könnten eine wichtige Rolle in dem Mechanismus zur Selbstregulation der PU.1-Expression eine Rolle spielen und unterstützen die These der Öffnung des Lokus von der URE aus. Eine weitere denkbare Erklärung ist das Zusammenwirken von

PU.1 mit zellspezifischen Zielgenen. In bisher unveröffentlichten Daten konnte gezeigt werden, dass die Induktion von PU.1 in myeloischen Vorläufern zur Assoziierung von EGR2 mit der -12kb DHS führt (Korrespondenz Constanze Bonifer). Faktoren, die durch höhere PU.1 Expressionslevel in myeloischen Zellen induziert werden, wie z.B. EGR2 (Laslo, et al., 2006), könnten zusammen mit PU.1 kooperativ an der -12kb DHS interagieren. In diesem Model würde ein Fehlen der URE die PU.1 Expression so stark reduzieren, das eine Induktion von EGR2 nicht mehr möglich wäre.

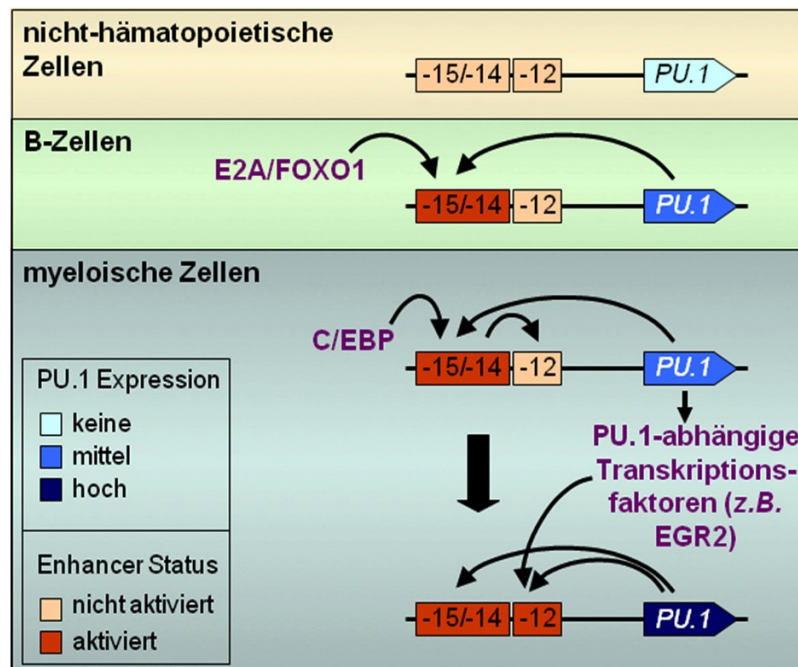


Abbildung 27: Eine geordnete Interaktion zwischen den *cis*-regulatorischen Elementen bestimmt das PU.1 Expressionsmuster.

Das Fehlen der PU.1 Expression in nicht-hämatopoietischen Zellen ist zurückzuführen auf die fehlende Aktivierung notwendiger Enhancer des PU.1 Gens. Die mittleren PU.1 Expressionslevel in B-Zellen sind gesteuert von der Bindung eines B-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktorkomplexes an die -14kb DHS. Dieser enthält unter anderem die Faktoren E2A und FOXO1 und führt zu der Etablierung einer selbstregulatorischen Schleife von und durch PU.1. Dieser Komplex ist nicht in der Lage, zusätzliche *cis*-regulatorische Elemente im PU.1 Lokus zu aktivieren. Im Gegensatz dazu wird in myeloischen Vorläuferzellen C/EBP α exprimiert, welches an die URE bindet. Das induziert die -12kb DHS Aktivierung um eine PU.1 autoregulatorische Schleife zu etablieren und die Bindung zusätzlicher PU.1 induzierter Faktoren wie z.B. EGR2, um die PU.1 Expression zu erhöhen. Schwarze Pfeile: Interaktion von Transkriptionsfaktoren mit nicht-kodierender RNA, roter Pfeil: Enhancer-Promotor-Interaktion

Die gezeigten Beweise für eine Aktivierung der -12kb DHS durch die Bindung von C/EBP α an die URE lassen vermuten, dass zumindest einige der mit PU.1 assoziierten DHS einem ähnlichen Mechanismus hierarchischer Regulation durch eine Interaktion *cis*-regulatorischer Elemente unterworfen sind.

PU.1 wird innerhalb der myeloischen Linie ebenfalls in Mastzellen exprimiert, die durch ein eigenes Netzwerk von Transkriptionsfaktoren reguliert werden und z.B. GATA2 exprimieren (Walsh, et al., 2002). Auch konnte in bisher unveröffentlichten Daten gezeigt werden, dass die -10kb DHS in der Lage ist, RelA zu binden. Ob dies von Relevanz für die Abschaltung der PU.1 Expression während der Osteoklastendifferenzierung aus myeloischen Vorläufern ist, bleibt in zukünftigen Studien zu klären. Wie die URE in diesen Zelltypen reguliert wird und mit welchen *cis*-regulatorischen Elementen sie dabei kooperiert, ist bis jetzt nicht geklärt. Die genomweiten Daten implizieren, dass in Abhängigkeit von der Anzahl der verschiedenen Zelltypen in denen ein regulatorisches Element aktiv ist, verschiedene Kombinationen von Transkriptionsfaktoren benutzt werden, um die Funktion des regulatorischen Elements zu erhalten.

4.4 PU.1 Regulation in B-lymphoiden Zellen

Während der -12kb Enhancer durch PU.1 Bindung aktiviert wird, erfolgt die Aktivierung der URE in der frühen hämatopoietischen Entwicklung durch Runx1. Sobald während der Differenzierung andere Faktoren wie z.B. C/EBP α exprimiert werden, ist die Bindung von Runx1 an die URE nicht mehr notwendig, um einen aktiven Chromatinstatus aufrecht zu erhalten. C/EBP α ist jedoch spezifisch für myeloische Zellen. Welche Faktoren könnten in B-Zellen einen aktiven Chromatinstatus an der URE vermitteln? Neue Arbeiten in B-Zellen zeigen, dass im Gegensatz zur -12kb DHS die URE von B-zellspezifischen Faktoren wie E2A und FOXO1 kooperativ

mit PU.1 gebunden wird. Vermutlich gehört die URE damit in die Klasse distaler *cis*-regulatorischer Elemente, die je nach Zelltyp unterschiedliche Kombinationen von zellspezifischen Transkriptionsfaktoren binden können, um einen aktiven Chromatinstatus zu erhalten.

Die URE kann als ein wichtiges Paradigma dienen, wie *cis*-regulatorische Elemente verschiedene Kombinationen zelltypspezifischer Faktoren benutzen, um eine differentielle Expression in verschiedenen Zelltypen zu gewährleisten.

Literaturverzeichnis

Accili, Domenico; Arden, Karen C. (2004): FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. In: *Cell*, Jg. 117, H. 4, S. 421–426.

Antonarakis, S. E.; Irkin, S. H.; Cheng, T. C.; Scott, A. F.; Sexton, J. P.; Trusko, S. P. et al. (1984): beta-Thalassemia in American Blacks: novel mutations in the "TATA" box and an acceptor splice site. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 81, H. 4, S. 1154–1158.

Aster, J. C.; Xu, L.; Karnell, F. G.; Patriub, V.; Pui, J. C.; Pear, W. S. (2000): Essential roles for ankyrin repeat and transactivation domains in induction of T-cell leukemia by notch1. In: *Molecular and cellular biology*, Jg. 20, H. 20, S. 7505–7515.

Atchison, M. L. (1988): Enhancers: mechanisms of action and cell specificity. In: *Annual review of cell biology*, Jg. 4, S. 127–153. Online verfügbar unter doi:10.1146/annurev.cb.04.110188.001015.

Athanasiou, M.; LeGallic, L.; Watson, D. K.; Blair, D. G.; Mavrothalassitis, G. (2000): Suppression of the Ewing's sarcoma phenotype by FLI1/ERF repressor hybrids. In: *Cancer gene therapy*, Jg. 7, H. 8, S. 1188–1195. Online verfügbar unter doi:10.1038/sj.cgt.7700220.

Athanasiou, M.; Mavrothalassitis, G.; Sun-Hoffman, L.; Blair, D. G. (2000): FLI-1 is a suppressor of erythroid differentiation in human hematopoietic cells. In: *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, Jg. 14, H. 3, S. 439–445.

Back, Jonathan; Dierich, Andrée; Bronn, Corinne; Kastner, Philippe; Chan, Susan (2004): PU.1 determines the self-renewal capacity of erythroid progenitor cells. In: *Blood*, Jg. 103, H. 10, S. 3615–3623. Online verfügbar unter doi:10.1182/blood-2003-11-4089.

Bain, G.; Maandag, E. C.; Izon, D. J.; Amsen, D.; Kruisbeek, A. M.; Weintraub, B. C. et al. (1994): E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements. In: *Cell*, Jg. 79, H. 5, S. 885–892.

Bank, Arthur (2006): Regulation of human fetal hemoglobin: new players, new complexities. In: *Blood*, Jg. 107, H. 2, S. 435–443. Online verfügbar unter doi:10.1182/blood-2005-05-2113.

Blackwood, E. M.; Kadonaga, J. T. (1998): Going the distance: a current view of enhancer action. In: *Science* (New York, N.Y.), Jg. 281, H. 5373, S. 60–63.

Boyadjiev, S. A.; Jabs, E. W. (2000): Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) as a knowledgebase for human developmental disorders. In: *Clinical genetics*, Jg. 57, H. 4, S. 253–266.

Bradshaw, Sarah; Zheng, W. Jim; Tsoi, Lam C.; Gilkeson, Gary; Zhang, Xian K. (2008): A role for Fli-1 in B cell proliferation: implications for SLE pathogenesis. In: *Clinical immunology* (Orlando, Fla.), Jg. 129, H. 1, S. 19–30. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.clim.2008.05.010.

Brivanlou, Ali H.; Darnell, James E. (2002): Signal transduction and the control of gene expression. In: *Science* (New York, N.Y.), Jg. 295, H. 5556, S. 813–818. Online verfügbar unter doi:10.1126/science.1066355.

Burda, P.; Laslo, P.; Stopka, T. (2010): The role of PU.1 and GATA-1 transcription factors during normal and leukemogenic hematopoiesis. In: *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, Jg. 24, H. 7, S. 1249–1257. Online verfügbar unter doi:10.1038/leu.2010.104.

Bussmann, Lars H.; Schubert, Alexis; Vu Manh, Thien Phong; Andres, Luisa de; Desbordes, Sabrina C.; Parra, Maribel et al. (2009): A robust and highly efficient immune cell reprogramming system. In: *Cell stem cell*, Jg. 5, H. 5, S. 554–566. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.stem.2009.10.004.

Capelson, Maya; Corces, Victor G. (2004): Boundary elements and nuclear organization. In: *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, Jg. 96, H. 8, S. 617–629. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.biolcel.2004.06.004.

Chen, Kevin; Rajewsky, Nikolaus (2007): The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. In: *Nature reviews. Genetics*, Jg. 8, H. 2, S. 93–103. Online verfügbar unter doi:10.1038/nrg1990.

Cook, Wendy D.; McCaw, Benjamin J.; Herring, Christopher; John, Deborah L.; Foote, Simon J.; Nutt, Stephen L.; Adams, Jerry M. (2004): PU.1 is a suppressor of myeloid leukemia, inactivated in mice by gene deletion and mutation of its DNA binding domain. In: *Blood*, Jg. 104, H. 12, S. 3437–3444. Online verfügbar unter doi:10.1182/blood-2004-06-2234.

Crossley, M.; Brownlee, G. G. (1990): Disruption of a C/EBP binding site in the factor IX promoter is associated with haemophilia B. In: *Nature*, Jg. 345, H. 6274, S. 444–446. Online verfügbar unter doi:10.1038/345444a0.

Dahl, Richard; Iyer, Sangeeta R.; Owens, Kristin S.; Cuylear, Dorothy D.; Simon, M. Celeste (2007): The transcriptional repressor GFI-1 antagonizes PU.1 activity through protein-protein interaction. In: The Journal of biological chemistry, Jg. 282, H. 9, S. 6473–6483. Online verfügbar unter doi:10.1074/jbc.M607613200.

Dakic, Aleksandar; Metcalf, Donald; Di Rago, Ladina; Mifsud, Sandra; Wu, Li; Nutt, Stephen L. (2005): PU.1 regulates the commitment of adult hematopoietic progenitors and restricts granulopoiesis. In: The Journal of experimental medicine, Jg. 201, H. 9, S. 1487–1502. Online verfügbar unter doi:10.1084/jem.20050075.

Davidson, Eric H.; Rast, Jonathan P.; Oliveri, Paola; Ransick, Andrew; Calestani, Cristina; Yuh, Chiou-Hwa et al. (2002): A genomic regulatory network for development. In: Science (New York, N.Y.), Jg. 295, H. 5560, S. 1669–1678. Online verfügbar unter doi:10.1126/science.1069883.

DeKoter, Rodney P.; Kamath, Meghana B.; Houston, Isaac B.: Analysis of concentration-dependent functions of PU.1 in hematopoiesis using mouse models. In: Blood cells, molecules & diseases, Jg. 39, H. 3, S. 316–320. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.bcmd.2007.06.004.

DeKoter, Rodney P.; Schweitzer, Brock L.; Kamath, Meghana B.; Jones, Darrel; Tagoh, Hiromi; Bonifer, Constanze et al. (2007): Regulation of the interleukin-7 receptor alpha promoter by the Ets transcription factors PU.1 and GA-binding protein in developing B cells. In: The Journal of biological chemistry, Jg. 282, H. 19, S. 14194–14204. Online verfügbar unter doi:10.1074/jbc.M700377200.

Delattre, O.; Zucman, J.; Plougastel, B.; Desmaze, C.; Melot, T.; Peter, M. et al. (1992): Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. In: Nature, Jg. 359, H. 6391, S. 162–165. Online verfügbar unter doi:10.1038/359162a0.

Dexter, T. M.; Allen, T. D.; Scott, D.; Teich, N. M. (1979): Isolation and characterisation of a bipotential haematopoietic cell line. In: Nature, Jg. 277, H. 5696, S. 471–474.

Dynlacht, B. D. (1997): Regulation of transcription by proteins that control the cell cycle. In: Nature, Jg. 389, H. 6647, S. 149–152. Online verfügbar unter doi:10.1038/38225.

Ebralidze, Alexander K.; Guibal, Florence C.; Steidl, Ulrich; Zhang, Pu; Lee, Sanghoon; Bartholdy, Boris et al. (2008): PU.1 expression is modulated by the balance of functional sense and antisense RNAs regulated by a shared cis-regulatory element. In: Genes & development, Jg. 22, H. 15, S. 2085–2092. Online verfügbar unter doi:10.1101/gad.1654808.

Eitzman, D. T.; Chi, L.; Saggin, L.; Schwartz, R. S.; Lucchesi, B. R.; Fay, W. P. (1994): Heparin neutralization by platelet-rich thrombi. Role of platelet factor 4. In: *Circulation*, Jg. 89, H. 4, S. 1523–1529.

Ferrando, Adolfo A. (2009): The role of NOTCH1 signaling in T-ALL. In: *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology*. American Society of Hematology. Education Program, S. 353–361. Online verfügbar unter doi:10.1182/asheducation-2009.1.353.

Fiering, S.; Whitelaw, E.; Martin, D. I. (2000): To be or not to be active: the stochastic nature of enhancer action. In: *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, Jg. 22, H. 4, S. 381–387. Online verfügbar unter doi:10.1002/(SICI)1521-1878(200004)22:4<381::AID-BIES8>3.0.CO;2-E.

Fourel, Geneviève; Magdinier, Frédérique; Gilson, Eric (2004): Insulator dynamics and the setting of chromatin domains. In: *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, Jg. 26, H. 5, S. 523–532. Online verfügbar unter doi:10.1002/bies.20028.

Friedman, Alan D. (2002): Transcriptional regulation of granulocyte and monocyte development. In: *Oncogene*, Jg. 21, H. 21, S. 3377–3390. Online verfügbar unter doi:10.1038/sj.onc.1205324.

Friedman, Alan D. (2002): Transcriptional regulation of myelopoiesis. In: *International journal of hematology*, Jg. 75, H. 5, S. 466–472.

Furney, Simon J.; Higgins, Desmond G.; Ouzounis, Christos A.; López-Bigas, Núria (2006): Structural and functional properties of genes involved in human cancer. In: *BMC genomics*, Jg. 7, S. 3. Online verfügbar unter doi:10.1186/1471-2164-7-3.

Gabellini, Davide; Green, Michael R.; Tupler, Rossella (2002): Inappropriate gene activation in FSHD: a repressor complex binds a chromosomal repeat deleted in dystrophic muscle. In: *Cell*, Jg. 110, H. 3, S. 339–348.

Gallant, Sarah; Gilkeson, Gary: ETS transcription factors and regulation of immunity. In: *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, Jg. 54, H. 3, S. 149–163. Online verfügbar unter doi:10.1007/s00005-006-0017-z.

Galloway, Jenna L.; Wingert, Rebecca A.; Thisse, Christine; Thisse, Bernard; Zon, Leonard I. (2005): Loss of gata1 but not gata2 converts erythropoiesis to myelopoiesis in zebrafish embryos. In: *Developmental cell*, Jg. 8, H. 1, S. 109–116. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.devcel.2004.12.001.

Gershenzon, Naum I.; Ioshikhes, Ilya P. (2005): Synergy of human Pol II core promoter elements revealed by statistical sequence analysis. In: *Bioinformatics* (Oxford, England), Jg. 21, H. 8, S. 1295–1300. Online verfügbar unter doi:10.1093/bioinformatics/bti172.

Gershenzon, Naum I.; Stormo, Gary D.; Ioshikhes, Ilya P. (2005): Computational technique for improvement of the position-weight matrices for the DNA/protein binding sites. In: *Nucleic acids research*, Jg. 33, H. 7, S. 2290–2301. Online verfügbar unter doi:10.1093/nar/gki519.

Ghisletti, Serena; Barozzi, Iros; Mietton, Flore; Polletti, Sara; Santa, Francesca de; Venturini, Elisa et al. (2010): Identification and characterization of enhancers controlling the inflammatory gene expression program in macrophages. In: *Immunity*, Jg. 32, H. 3, S. 317–328. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.immuni.2010.02.008.

Graves, B. J.; Petersen, J. M. (1998): Specificity within the ets family of transcription factors. In: *Advances in cancer research*, Jg. 75, S. 1–55.

Gross, D. S.; Garrard, W. T. (1988): Nuclease hypersensitive sites in chromatin. In: *Annual review of biochemistry*, Jg. 57, S. 159–197. Online verfügbar unter doi:10.1146/annurev.bi.57.070188.001111.

Harris, Miera B.; Mostecky, Justin; Rothman, Paul B. (2005): Repression of an interleukin-4-responsive promoter requires cooperative BCL-6 function. In: *The Journal of biological chemistry*, Jg. 280, H. 13, S. 13114–13121. Online verfügbar unter doi:10.1074/jbc.M412649200.

Heintzman, Nathaniel D.; Stuart, Rhona K.; Hon, Gary; Fu, Yutao; Ching, Christina W.; Hawkins, R. David et al. (2007): Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. In: *Nature genetics*, Jg. 39, H. 3, S. 311–318. Online verfügbar unter doi:10.1038/ng1966.

Heinz, Sven; Benner, Christopher; Spann, Nathanael; Bertolino, Eric; Lin, Yin C.; Laslo, Peter et al. (2010): Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. In: *Molecular cell*, Jg. 38, H. 4, S. 576–589. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.molcel.2010.05.004.

Hershko, A.; Ciechanover, A. (1998): The ubiquitin system. In: *Annual review of biochemistry*, Jg. 67, S. 425–479. Online verfügbar unter doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.425.

Hobbs, K.; Negri, J.; Klinnert, M.; Rosenwasser, L. J.; Borish, L. (1998): Interleukin-10 and transforming growth factor-beta promoter polymorphisms in allergies and asthma. In: American journal of respiratory and critical care medicine, Jg. 158, H. 6, S. 1958–1962.

Hoogenkamp, Maarten; Lichtinger, Monika; Krysinska, Hanna; Lancrin, Christophe; Clarke, Deborah; Williamson, Andrew et al. (2009): Early chromatin unfolding by RUNX1: a molecular explanation for differential requirements during specification versus maintenance of the hematopoietic gene expression program. In: Blood, Jg. 114, H. 2, S. 299–309. Online verfügbar unter doi:10.1182/blood-2008-11-191890.

Hunter, T. (2000): Signaling--2000 and beyond. In: Cell, Jg. 100, H. 1, S. 113–127.

Hüttenhofer, Alexander; Schattner, Peter; Polacek, Norbert (2005): Non-coding RNAs: hope or hype? In: Trends in genetics : TIG, Jg. 21, H. 5, S. 289–297. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.tig.2005.03.007.

Iwasaki, Hiromi; Somoza, Chamorro; Shigematsu, Hirokazu; Duprez, Estelle A.; Iwasaki-Arai, Junko; Mizuno, Shin-Ichi et al. (2005): Distinctive and indispensable roles of PU.1 in maintenance of hematopoietic stem cells and their differentiation. In: Blood, Jg. 106, H. 5, S. 1590–1600. Online verfügbar unter doi:10.1182/blood-2005-03-0860.

Jimenez-Sanchez, G.; Childs, B.; Valle, D. (2001): Human disease genes. In: Nature, Jg. 409, H. 6822, S. 853–855. Online verfügbar unter doi:10.1038/35057050.

Koch, Christoph M.; Andrews, Robert M.; Flicek, Paul; Dillon, Shane C.; Karaöz, Ulaş; Clelland, Gayle K. et al. (2007): The landscape of histone modifications across 1% of the human genome in five human cell lines. In: Genome research, Jg. 17, H. 6, S. 691–707. Online verfügbar unter doi:10.1101/gr.5704207.

Kok, Y. J. de; Vossenaar, E. R.; Cremers, C. W.; Dahl, N.; Laporte, J.; Hu, L. J. et al. (1996): Identification of a hot spot for microdeletions in patients with X-linked deafness type 3 (DFN3) 900 kb proximal to the DFN3 gene POU3F4. In: Human molecular genetics, Jg. 5, H. 9, S. 1229–1235.

Kulozik, A. E.; Bellan-Koch, A.; Bail, S.; Kohne, E.; Kleihauer, E. (1991): Thalassemia intermedia: moderate reduction of beta globin gene transcriptional activity by a novel mutation of the proximal CACCC promoter element. In: Blood, Jg. 77, H. 9, S. 2054–2058.

Lalioti, M. D.; Scott, H. S.; Buresi, C.; Rossier, C.; Bottani, A.; Morris, M. A. et al. (1997): Dodecamer repeat expansion in cystatin B gene in progressive myoclonus epilepsy. In: *Nature*, Jg. 386, H. 6627, S. 847–851. Online verfügbar unter doi:10.1038/386847a0.

Laslo, Peter; Spooner, Chauncey J.; Warmflash, Aryeh; Lancki, David W.; Lee, Hyun-Jun; Sciammas, Roger et al. (2006): Multilineage transcriptional priming and determination of alternate hematopoietic cell fates. In: *Cell*, Jg. 126, H. 4, S. 755–766. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.cell.2006.06.052.

Lausen, J.; Liu, S.; Fliegau, M.; Lübbert, M.; Werner, M. H. (2006): ELA2 is regulated by hematopoietic transcription factors, but not repressed by AML1-ETO. In: *Oncogene*, Jg. 25, H. 9, S. 1349–1357. Online verfügbar unter doi:10.1038/sj.onc.1209181.

Leddin, Mathias; Perrod, Chiara; Hoogenkamp, Maarten; Ghani, Saeed; Assi, Salam; Heinz, Sven et al. (2011): Two distinct auto-regulatory loops operate at the PU.1 locus in B cells and myeloid cells. In: *Blood*. Online verfügbar unter doi:10.1182/blood-2010-08-302976.

Leprince, D.; Gegonne, A.; Coll, J.; Taisne, C. de; Schneeberger, A.; Lagrou, C.; Stehelin, D.: A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26. In: *Nature*, Jg. 306, H. 5941, S. 395–397.

Lettice, Laura A.; Heaney, Simon J. H.; Purdie, Lorna A.; Li, Li; Beer, Philippe de; Oostra, Ben A. et al. (2003): A long-range Shh enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with pre-axial polydactyly. In: *Human molecular genetics*, Jg. 12, H. 14, S. 1725–1735.

Levine, Michael; Tjian, Robert (2003): Transcription regulation and animal diversity. In: *Nature*, Jg. 424, H. 6945, S. 147–151. Online verfügbar unter doi:10.1038/nature01763.

Lewis, B. A.; Kim, T. K.; Orkin, S. H. (2000): A downstream element in the human beta-globin promoter: evidence of extended sequence-specific transcription factor IID contacts. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 97, H. 13, S. 7172–7177. Online verfügbar unter doi:10.1073/pnas.120181197.

Li, Lin; He, Shihua; Sun, Jian-Min; Davie, James R. (2004): Gene regulation by Sp1 and Sp3. In: *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, Jg. 82, H. 4, S. 460–471. Online verfügbar unter doi:10.1139/o04-045.

Li, Qiliang; Peterson, Kenneth R.; Fang, Xiangdong; Stamatoyannopoulos, George (2002): Locus control regions. In: *Blood*, Jg. 100, H. 9, S. 3077–3086. Online verfügbar unter doi:10.1182/blood-2002-04-1104.

Li, Y.; Okuno, Y.; Zhang, P.; Radomska, H. S.; Chen, H.; Iwasaki, H. et al. (2001): Regulation of the PU.1 gene by distal elements. In: *Blood*, Jg. 98, H. 10, S. 2958–2965.

Lin, H.; Grosschedl, R. (1995): Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF. In: *Nature*, Jg. 376, H. 6537, S. 263–267. Online verfügbar unter doi:10.1038/376263a0.

Loots, Gabriela G.; Kneissel, Michaela; Keller, Hansjoerg; Baptist, Myma; Chang, Jessie; Collette, Nicole M. et al. (2005): Genomic deletion of a long-range bone enhancer misregulates sclerostin in Van Buchem disease. In: *Genome research*, Jg. 15, H. 7, S. 928–935. Online verfügbar unter doi:10.1101/gr.3437105.

Ludlow, L. B.; Schick, B. P.; Budarf, M. L.; Driscoll, D. A.; Zackai, E. H.; Cohen, A.; Konkle, B. A. (1996): Identification of a mutation in a GATA binding site of the platelet glycoprotein Ibbeta promoter resulting in the Bernard-Soulier syndrome. In: *The Journal of biological chemistry*, Jg. 271, H. 36, S. 22076–22080.

Masotti, Cibele; Armelin-Correa, Lucia M.; Splendore, Alessandra; Lin, Chin J.; Barbosa, Angela; Sogayar, Mari C.; Passos-Bueno, Maria Rita (2005): A functional SNP in the promoter region of TCOF1 is associated with reduced gene expression and YY1 DNA-protein interaction. In: *Gene*, Jg. 359, S. 44–52. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.gene.2005.06.004.

Maston, Glenn A.; Evans, Sara K.; Green, Michael R. (2006): Transcriptional regulatory elements in the human genome. In: *Annual review of genomics and human genetics*, Jg. 7, S. 29–59. Online verfügbar unter doi:10.1146/annurev.genom.7.080505.115623.

Mavrothalassitis, G.; Ghysdael, J. (2000): Proteins of the ETS family with transcriptional repressor activity. In: *Oncogene*, Jg. 19, H. 55, S. 6524–6532. Online verfügbar unter doi:10.1038/sj.onc.1204045.

McKercher, S. R.; Torbett, B. E.; Anderson, K. L.; Henkel, G. W.; Vestal, D. J.; Baribault, H. et al. (1996): Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. In: *The EMBO journal*, Jg. 15, H. 20, S. 5647–5658.

Metcalf, Donald (2006): Loss of PU.1: one of the many roads to myeloid leukemia. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, Jg. 5, H. 7, S. 673–674.

Metcalf, Donald; Dakic, Aleksandar; Mifsud, Sandra; Di Rago, Ladina; Wu, Li; Nutt, Stephen (2006): Inactivation of PU.1 in adult mice leads to the development of myeloid leukemia. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 103, H. 5, S. 1486–1491. Online verfügbar unter doi:10.1073/pnas.0510616103.

Moreau-Gachelin, F. (1994): Spi-1/PU.1: an oncogene of the Ets family. In: *Biochimica et biophysica acta*, Jg. 1198, H. 2-3, S. 149–163.

Moreau-Gachelin, F.; Ray, D.; Both, N. J. de; van der Feltz, M. J.; Tambourin, P.; Tavitian, A. (1990): Spi-1 oncogene activation in Rauscher and Friend murine virus-induced acute erythroleukemias. In: *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, Jg. 4, H. 1, S. 20–23.

Moreau-Gachelin, F.; Tavitian, A.; Tambourin, P. (1988): Spi-1 is a putative oncogene in virally induced murine erythroleukaemias. In: *Nature*, Jg. 331, H. 6153, S. 277–280. Online verfügbar unter doi:10.1038/331277a0.

Moreau-Gachelin, F.; Wendling, F.; Molina, T.; Denis, N.; Titeux, M.; Grimmer, G. et al. (1996): Spi-1/PU.1 transgenic mice develop multistep erythroleukemias. In: *Molecular and cellular biology*, Jg. 16, H. 5, S. 2453–2463.

Morita, S.; Kojima, T.; Kitamura, T. (2000): Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. In: *Gene therapy*, Jg. 7, H. 12, S. 1063–1066. Online verfügbar unter doi:10.1038/sj.gt.3301206.

Mouly, Enguerran; Chemin, Karine; Nguyen, Hai Vu; Chopin, Martine; Mesnard, Laurent; Leite-de-Moraes, Maria et al. (2010): The Ets-1 transcription factor controls the development and function of natural regulatory T cells. In: *The Journal of experimental medicine*, Jg. 207, H. 10, S. 2113–2125. Online verfügbar unter doi:10.1084/jem.20092153.

Müller, Anke; Lange, Karin; Gaiser, Timo; Hofmann, Manfred; Bartels, Heinrich; Feller, Alfred C.; Merz, Hartmut (2002): Expression of angiopoietin-1 and its receptor TEK in hematopoietic cells from patients with myeloid leukemia. In: *Leukemia research*, Jg. 26, H. 2, S. 163–168.

Müller, Claudia I.; Engelhardt, Monika; Laubenberger, Jörg; Kunzmann, Regina; Engelhardt, Rupert; Lübbert, Michael (2002): Myelodysplastic syndrome in transformation to acute myeloid leukemia presenting with diabetes insipidus: due to pituitary infiltration association with abnormalities of chromosomes 3 and 7. In: *European journal of haematology*, Jg. 69, H. 2, S. 115–119.

Müller, Claudia I.; Rüter, Björn; Koeffler, H. Phillip; Lübbert, Michael (2006): DNA hypermethylation of myeloid cells, a novel therapeutic target in MDS and AML. In: *Current pharmaceutical biotechnology*, Jg. 7, H. 5, S. 315–321.

Nunn, M. F.; Seeburg, P. H.; Moscovici, C.; Duesberg, P. H.: Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene. In: *Nature*, Jg. 306, H. 5941, S. 391–395.

Nutt, S. L.; Heavey, B.; Rolink, A. G.; Busslinger, M. (1999): Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. In: *Nature*, Jg. 401, H. 6753, S. 556–562. Online verfügbar unter doi:10.1038/44076.

Nutt, Stephen L.; Metcalf, Donald; D'Amico, Angela; Polli, Matthew; Wu, Li (2005): Dynamic regulation of PU.1 expression in multipotent hematopoietic progenitors. In: *The Journal of experimental medicine*, Jg. 201, H. 2, S. 221–231. Online verfügbar unter doi:10.1084/jem.20041535.

Ogawa, M. (1993): Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. In: *Blood*, Jg. 81, H. 11, S. 2844–2853.

Ogbourne, S.; Antalis, T. M. (1998): Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. In: *The Biochemical journal*, Jg. 331 (Pt 1), S. 1–14.

Oikawa, Tsuneyuki; Yamada, Toshiyuki (2003): Molecular biology of the Ets family of transcription factors. In: *Gene*, Jg. 303, S. 11–34.

Okuno, Yutaka; Huang, Gang; Rosenbauer, Frank; Evans, Erica K.; Radomska, Hanna S.; Iwasaki, Hiromi et al. (2005): Potential autoregulation of transcription factor PU.1 by an upstream regulatory element. In: *Molecular and cellular biology*, Jg. 25, H. 7, S. 2832–2845. Online verfügbar unter doi:10.1128/MCB.25.7.2832-2845.2005.

Olive, Virginie; Wagner, Nicole; Chan, Susan; Kastner, Philippe; Vannetti, Christine; Cuzin, François; Rassoulzadegan, Minoo (2007): PU.1 (Sfpi1), a pleiotropic regulator expressed from the first embryonic stages with a crucial function in germinal progenitors. In: *Development* (Cambridge, England), Jg. 134, H. 21, S. 3815–3825. Online verfügbar unter doi:10.1242/dev.003467.

Oliveri, Paola; Davidson, Eric H. (2004): Gene regulatory network analysis in sea urchin embryos. In: *Methods in cell biology*, Jg. 74, S. 775–794.

Orkin, S. H.; Wang, J.; Kim, J.; Chu, J.; Rao, S.; Theunissen, T. W. et al. (2008): The transcriptional network controlling pluripotency in ES cells. In: Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology, Jg. 73, S. 195–202. Online verfügbar unter doi:10.1101/sqb.2008.73.001.

Orkin, Stuart H.; Zon, Leonard I. (2008): Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. In: Cell, Jg. 132, H. 4, S. 631–644. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.cell.2008.01.025.

Orkin, Stuart H.; Zon, Leonard I. (2008): SnapShot: hematopoiesis. In: Cell, Jg. 132, H. 4, S. 712. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.cell.2008.02.013.

Orphanides, G.; Lagrange, T.; Reinberg, D. (1996): The general transcription factors of RNA polymerase II. In: Genes & development, Jg. 10, H. 21, S. 2657–2683.

Polli, Matthew; Dakic, Aleksandar; Light, Amanda; Wu, Li; Tarlinton, David M.; Nutt, Stephen L. (2005): The development of functional B lymphocytes in conditional PU.1 knock-out mice. In: Blood, Jg. 106, H. 6, S. 2083–2090. Online verfügbar unter doi:10.1182/blood-2005-01-0283.

Pop, Ramona; Shearstone, Jeffrey R.; Shen, Qichang; Liu, Ying; Hallstrom, Kelly; Koulis, Miroslav et al. (2010): A key commitment step in erythropoiesis is synchronized with the cell cycle clock through mutual inhibition between PU.1 and S-phase progression. In: PLoS biology, Jg. 8, H. 9. Online verfügbar unter doi:10.1371/journal.pbio.1000484.

Prawitt, Dirk; Enklaar, Thorsten; Gärtner-Rupprecht, Barbara; Spangenberg, Christian; Lausch, Ekkehart; Reutzel, Dirk et al. (2005): Microdeletion and IGF2 loss of imprinting in a cascade causing Beckwith-Wiedemann syndrome with Wilms' tumor. In: Nature genetics, Jg. 37, H. 8, S. 785-6; author reply 786-7. Online verfügbar unter doi:10.1038/ng0805-785.

Prawitt, Dirk; Enklaar, Thorsten; Gärtner-Rupprecht, Barbara; Spangenberg, Christian; Oswald, Monika; Lausch, Ekkehart et al. (2005): Microdeletion of target sites for insulator protein CTCF in a chromosome 11p15 imprinting center in Beckwith-Wiedemann syndrome and Wilms' tumor. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Jg. 102, H. 11, S. 4085–4090. Online verfügbar unter doi:10.1073/pnas.0500037102.

Recillas-Targa, Félix; Valadez-Graham, Viviana; Farrell, Catherine M. (2004): Prospects and implications of using chromatin insulators in gene therapy and transgenesis. In: *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, Jg. 26, H. 7, S. 796–807. Online verfügbar unter doi:10.1002/bies.20059.

Rhodes, Jennifer; Hagen, Andreas; Hsu, Karl; Deng, Min; Liu, Ting Xi; Look, A. Thomas; Kanki, John P. (2005): Interplay of pu.1 and gata1 determines myelo-erythroid progenitor cell fate in zebrafish. In: *Developmental cell*, Jg. 8, H. 1, S. 97–108. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.devcel.2004.11.014.

Richards, R. S.; Roberts, T. K.; McGregor, N. R.; Dunstan, R. H.; Butt, H. L. (1998): The role of erythrocytes in the inactivation of free radicals. In: *Medical hypotheses*, Jg. 50, H. 5, S. 363–367.

Rosenbauer, Frank; Owens, Bronwyn M.; Yu, Li; Tumang, Joseph R.; Steidl, Ulrich; Kutok, Jeffery L. et al. (2006): Lymphoid cell growth and transformation are suppressed by a key regulatory element of the gene encoding PU.1. In: *Nature genetics*, Jg. 38, H. 1, S. 27–37. Online verfügbar unter doi:10.1038/ng1679.

Rosenbauer, Frank; Wagner, Katharina; Kutok, Jeffery L.; Iwasaki, Hiromi; Le Beau, Michelle M.; Okuno, Yutaka et al. (2004): Acute myeloid leukemia induced by graded reduction of a lineage-specific transcription factor, PU.1. In: *Nature genetics*, Jg. 36, H. 6, S. 624–630. Online verfügbar unter doi:10.1038/ng1361.

Schmitt, Sabine; Prestel, Matthias; Paro, Renato (2005): Intergenic transcription through a polycomb group response element counteracts silencing. In: *Genes & development*, Jg. 19, H. 6, S. 697–708. Online verfügbar unter doi:10.1101/gad.326205.

Scott, E. W.; Simon, M. C.; Anastasi, J.; Singh, H. (1994): Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. In: *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 265, H. 5178, S. 1573–1577.

Sen, Ranjan; Grosschedl, Rudolf (2010): Memories of lost enhancers. In: *Genes & development*, Jg. 24, H. 10, S. 973–979. Online verfügbar unter doi:10.1101/gad.1930610.

Seth, Arun; Watson, Dennis K. (2005): ETS transcription factors and their emerging roles in human cancer. In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, Jg. 41, H. 16, S. 2462–2478. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.ejca.2005.08.013.

Sevilla, L.; Aperlo, C.; Dulic, V.; Chambard, J. C.; Boutonnet, C.; Pasquier, O. et al. (1999): The Ets2 transcription factor inhibits apoptosis induced by colony-stimulating factor 1 deprivation of macrophages through a Bcl-xL-dependent mechanism. In: *Molecular and cellular biology*, Jg. 19, H. 4, S. 2624–2634.

Simon, I.; Barnett, J.; Hannett, N.; Harbison, C. T.; Rinaldi, N. J.; Volkert, T. L. et al. (2001): Serial regulation of transcriptional regulators in the yeast cell cycle. In: *Cell*, Jg. 106, H. 6, S. 697–708.

Smale, Stephen T.; Kadonaga, James T. (2003): The RNA polymerase II core promoter. In: *Annual review of biochemistry*, Jg. 72, S. 449–479. Online verfügbar unter doi:10.1146/annurev.biochem.72.121801.161520.

Smith, Aileen M.; Sanchez, Maria-Jose; Follows, George A.; Kinston, Sarah; Donaldson, Ian J.; Green, Anthony R.; Göttgens, Berthold (2008): A novel mode of enhancer evolution: the Tal1 stem cell enhancer recruited a MIR element to specifically boost its activity. In: *Genome research*, Jg. 18, H. 9, S. 1422–1432. Online verfügbar unter doi:10.1101/gr.077008.108.

Spilianakis, Charalampos G.; Lalioti, Maria D.; Town, Terrence; Lee, Gap Ryol; Flavell, Richard A. (2005): Interchromosomal associations between alternatively expressed loci. In: *Nature*, Jg. 435, H. 7042, S. 637–645. Online verfügbar unter doi:10.1038/nature03574.

Srinivasan, Lakshmi; Atchison, Michael L. (2004): YY1 DNA binding and PcG recruitment requires CtBP. In: *Genes & development*, Jg. 18, H. 21, S. 2596–2601. Online verfügbar unter doi:10.1101/gad.1228204.

Steidl, Ulrich; Steidl, Christian; Ebralidze, Alexander; Chapuy, Björn; Han, Hye-Jung; Will, Britta et al. (2007): A distal single nucleotide polymorphism alters long-range regulation of the PU.1 gene in acute myeloid leukemia. In: *The Journal of clinical investigation*, Jg. 117, H. 9, S. 2611–2620. Online verfügbar unter doi:10.1172/JCI30525.

Tanimoto, K.; Liu, Q.; Bungert, J.; Engel, J. D. (1999): Effects of altered gene order or orientation of the locus control region on human beta-globin gene expression in mice. In: *Nature*, Jg. 398, H. 6725, S. 344–348. Online verfügbar unter doi:10.1038/18698.

Taylor, J. M.; Dupont-Versteegden, E. E.; Davies, J. D.; Hassell, J. A.; Houlé, J. D.; Gurley, C. M.; Peterson, C. A. (1997): A role for the ETS domain transcription factor PEA3 in myogenic differentiation. In: *Molecular and cellular biology*, Jg. 17, H. 9, S. 5550–5558.

Thyagarajan, Bargavi; Blaszcak, Adam G.; Chandler, Katherine J.; Watts, Jennifer L.; Johnson, W. Evan; Graves, Barbara J. (2010): ETS-4 is a transcriptional regulator of life span in *Caenorhabditis elegans*. In: *PLoS genetics*, Jg. 6, H. 9. Online verfügbar unter doi:10.1371/journal.pgen.1001125.

Treisman, R. (1994): Ternary complex factors: growth factor regulated transcriptional activators. In: *Current opinion in genetics & development*, Jg. 4, H. 1, S. 96–101.

Vangala, Rajani K.; Heiss-Neumann, Marion S.; Rangatia, Janki S.; Singh, Sheo M.; Schoch, Claudia; Tenen, Daniel G. et al. (2003): The myeloid master regulator transcription factor PU.1 is inactivated by AML1-ETO in t(8;21) myeloid leukemia. In: *Blood*, Jg. 101, H. 1, S. 270–277. Online verfügbar unter doi:10.1182/blood-2002-04-1288.

Vaquerizas, Juan M.; Kummerfeld, Sarah K.; Teichmann, Sarah A.; Luscombe, Nicholas M. (2009): A census of human transcription factors: function, expression and evolution. In: *Nature reviews. Genetics*, Jg. 10, H. 4, S. 252–263. Online verfügbar unter doi:10.1038/nrg2538.

Vigorito, Elena; Perks, Kerry L.; Abreu-Goodger, Cei; Bunting, Sam; Xiang, Zou; Kohlhaas, Susan et al. (2007): microRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells. In: *Immunity*, Jg. 27, H. 6, S. 847–859. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.immuni.2007.10.009.

Vilar, Jose M. G.; Saiz, Leonor (2005): DNA looping in gene regulation: from the assembly of macromolecular complexes to the control of transcriptional noise. In: *Current opinion in genetics & development*, Jg. 15, H. 2, S. 136–144. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.gde.2005.02.005.

Visel, Axel; Rubin, Edward M.; Pennacchio, Len A. (2009): Genomic views of distant-acting enhancers. In: *Nature*, Jg. 461, H. 7261, S. 199–205. Online verfügbar unter doi:10.1038/nature08451.

Wagner, T.; Wirth, J.; Meyer, J.; Zabel, B.; Held, M.; Zimmer, J. et al. (1994): Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. In: *Cell*, Jg. 79, H. 6, S. 1111–1120.

Walsh, Jonathan C.; DeKoter, Rodney P.; Lee, Hyun Jun; Smith, Erica D.; Lancki, David W.; Gurish, Michael F. et al. (2002): Cooperative and antagonistic interplay between PU.1 and GATA-2 in the specification of myeloid cell fates. In: *Immunity*, Jg. 17, H. 5, S. 665–676.

Walter, Matthew J.; Park, John S.; Ries, Rhonda E.; Lau, Steven K. M.; McLellan, Michael; Jaeger, Sara et al. (2005): Reduced PU.1 expression causes myeloid progenitor expansion and increased leukemia penetrance in mice expressing PML-RARalpha. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Jg. 102, H. 35, S. 12513–12518. Online verfügbar unter doi:10.1073/pnas.0504247102.

Walters, M. C.; Fiering, S.; Eidemiller, J.; Magis, W.; Groudine, M.; Martin, D. I. (1995): Enhancers increase the probability but not the level of gene expression. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Jg. 92, H. 15, S. 7125–7129.

Weigelt, Karin; Lichtinger, Monika; Rehli, Michael; Langmann, Thomas (2009): Transcriptomic profiling identifies a PU.1 regulatory network in macrophages. In: Biochemical and biophysical research communications, Jg. 380, H. 2, S. 308–312. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.bbrc.2009.01.067.

West, Adam G.; Fraser, Peter (2005): Remote control of gene transcription. In: Human molecular genetics, Jg. 14 Spec No 1, S. R101-11. Online verfügbar unter doi:10.1093/hmg/ddi104.

Xie, Huafeng; Ye, Min; Feng, Ru; Graf, Thomas (2004): Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. In: Cell, Jg. 117, H. 5, S. 663–676.

Ye, Min; Ermakova, Olga; Graf, Thomas (2005): PU.1 is not strictly required for B cell development and its absence induces a B-2 to B-1 cell switch. In: The Journal of experimental medicine, Jg. 202, H. 10, S. 1411–1422. Online verfügbar unter doi:10.1084/jem.20051089.

Yu, Channing; Cantor, Alan B.; Yang, Haidi; Browne, Carol; Wells, Richard A.; Fujiwara, Yuko; Orkin, Stuart H. (2002): Targeted deletion of a high-affinity GATA-binding site in the GATA-1 promoter leads to selective loss of the eosinophil lineage in vivo. In: The Journal of experimental medicine, Jg. 195, H. 11, S. 1387–1395.

Zarnegar, Mark A.; Chen, Jing; Rothenberg, Ellen V. (2010): Cell-type-specific activation and repression of PU.1 by a complex of discrete, functionally specialized cis-regulatory elements. In: Molecular and cellular biology, Jg. 30, H. 20, S. 4922–4939. Online verfügbar unter doi:10.1128/MCB.00354-10.

Abkürzungen

[α 32-P]dCTP Deoxycytosin 5'-Triphosphate[α 32-P]

[γ 32-P]dATP Deoxyadenosin 5'-Triphosphate[γ 32-P]

% Prozent

°C Grad Celsius

Aa Aminosäure

AD Aktivierungsdomäne

ALL akute lymphatische Leukämie

AML acute myeloische Leukämie

APC Allophycocyanin

ATCC American tissue culture collection

B B-Zelle

BAC bakterielles artifizielles Chromosom

bp Basepaar

BSA Bovine Serum Albumin

C Cytosine

ca. circa

CD Cluster of Differentiation

cDNA komplementäre DNA

C/EBP CCAATT/enhancer binding protein

ChIP- Chromatin-Immunopräzipitation

CLP Allgemeiner lymphatischer Vorläufer

CMP Allgemeiner myeloischer Vorläufer

CO₂ Kohlendioxid

csf1r Colony stimulating Factor 1 Receptor

Csf2ra (=Gm-csfr) Granulozyt/Makrophagen stimulierender Factor Receptor

DHS DNaseI hypersensitive Stelle

DMEM Dulbecco's modified Eagle medium

DMSO Dimethylsulfoxid

DNA Desoxyribonucleic Säure

dNTP Deoxynukleotid-Triphosphat

DTT Dithiotreitol

E Erythrozyt

Ebf1 early B Cell Factor 1

EDTA Ethylenediaminetetraacetate

et al. und andere

EtOH Ethanol

Ets DNA-Bindedomäne

FACS fluorescent-aktivierte Zellsortierung

FCS fötales Kälberserum

FITC Fluoresceinisothiocyanat

FL fötale Leber

Flt3 Fms- related Tyrosine kinase 3

Flt3L Flt3 Ligand

fw vorwärts

g Gravität

GMP granulozytärer/monozytischer Vorläufer

G/M-CSF Granulozyte/Makrophagen stimulierender Faktor

Gata1 GATA bindendes Protein 1 or Globin Transkription Factor 1

GFP grün floreszierendes Protein

Gra Granulozyte

Gy gray

h Stunden

HLH Helix-Loop-Helix-Domäne

HRP- Merretichperoxidase

HSC hämatopoietische Stammzelle

ID autoinhibitorische Domäne

Ig Immunoglobulin

IL Interleukin

IL7R Interleukin 7 Rezeptor

IRES internale ribosomale Eintrittsstelle

Kan-Kanamycin

Kb Kilobasen

KCl Kaliumchlorid

kDA KiloDalton

KM Knochenmark

KMM Knochenmark-abgeleitete Makrophagen

KH₂PO₄ Potassium Phosphate monobasic

LCR Lokus Kontroll Region

LN Lymphknoten

M molar

Mak Makrophage

MDS myeloisch.dysplastisches Syndrom

MEP Megakaryozytärer-erythrozytärer Vorläufer

mg Milligramm

MgCl₂ Magnesium Chlorid

MIG MSCV-IRES-GFP

min Minuten

Mk Megakaryozyt

ml Milliliter

mM milli molar

µg Microgram

µl Microliter

µM Micromolar

MP myeloischer Vorläufer

MPP multipotenter Vorläufer

mRNA Messenger Ribonukleinsäure

n Nummerr

Na₂HPO₄ Sodium Phosphate dibasic

NaCl Sodiumchloride

ng Nanogramm

Nk Natürliche Killerzelle

nm Nanometer

P Wahrscheinlichkeitswert

Pax5 paired box Gene 5

PBS Phosphat-gepufferte Saline

PcG	Polycomb Gruppe
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PE	Phycoerythrin
PI	Propidium Iodide
Pol	Polymerase
PU.1	Purin-reich 1
P/S	penicillin/streptomycin
qPCR	quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion
RBK	Erythrozyt
RD	repressorische Domäne
rev	rückwärts
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
T	Thymidin oder T-Zelle
T4	T4 DNA Polymerase
TAE	Tris/Acetate/EDTA Puffer
TBE	Tris/Borsäure/EDTA Puffer
Taq	Taqman DNA polymerase
TE	Tris/EDTA
tRNA	transfer RNA
TSS	Transkriptionsstartseite

Abkürzungen

u.a. unter anderem

URE upstream regulatory element

UV Ultraviolet

V Volt

WT Wild Typ

z.B. zum Beispiel

Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit, dass die von mir vorgelegte Dissertation ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde. Ich versichere, dass alle aus anderen Quellen übernommenen Daten und Konzepte, sowie Ergebnisse aus Kooperationsprojekten unter Angabe der Referenz gekennzeichnet sind.

Außerdem versichere ich, dass mir die aktuelle Promotionsordnung bekannt ist und ich mich nicht anderwärts um einen Doktorgrad bewerbe, bzw. noch keinen entsprechenden Doktorgrad besitze. Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Berlin, den 31.03.2011

Mathias Leddin

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Dr. Frank Rosenbauer bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, in seinem Labor meine Doktorarbeit durchzuführen. Ich danke ihm für seine finanzielle und wissenschaftliche Unterstützung. Ich bedanke mich bei Dr. Constanze Bonifer, Dr. Berthold Göttgens und deren Mitarbeitern für ihre kooperative Hilfe und Unterstützung, die einen entscheidenden Beitrag zur wissenschaftlichen Relevanz meines Projektes geleistet haben. Mein Dank gilt weiterhin Chiara Perrod, Saeed Ghani und Maarten Hoogenkamp, die mich experimentell wesentlich unterstützt haben.

Ich bedanke mich bei Victoria Malchin, Nancy Endruhn, Christin Graubmann und Lotte Huismann für deren exzellente Mausearbeit. Ich möchte mich bei allen weiteren Mitarbeitern der AG Rosenbauer für deren permanente technische Unterstützung sowie interessante und hilfreiche Diskussionen bedanken.

Natürlich wäre all das ohne die permante Unterstützung und Liebe meiner Familie, meiner Freunde und Olaf nicht möglich gewesen.

Publikationsliste

Publikationen

Leddin, Mathias; Perrod, Chiara; Hoogenkamp, Maarten; Ghani, Saeed; Assi, Salam; Heinz, Sven et al. (2011): Two distinct auto-regulatory loops operate at the PU.1 locus in B cells and myeloid cells. In: Blood. Online verfügbar unter doi:10.1182/blood-2010-08-302976.

Präsentationen und Konferenzen

Mai 2005 ; (Döllnsee, Deutschland) MDC/DKFZ Summer school “ Signal transduction and transcriptional regulation in cancer“ (Poster)

Sep. 2009 MDC PhD Retreat (Poster)

Juni 2010 (Wilsede, Deutschland) Wilsede Meeting 2010 “Modern Trends in Human Leukemia and cancer” (Poster)

Stipendien

Juni 2010 Mildred Scheel travel grant, Wilsede meeting 2010

Berlin, den 31.3.2011

Mathias Leddin